

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio morfológico de los tumores inducidos
experimentalmente con metil nitrosourea en la rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Adela Pelayo Alarcón

DIRECTORES:

Juliana Fariña González
Agustín Bullón Ramírez

Madrid, 2015

TF
1984
058

Adela Pelayo Alarcón



x-53-117512-9

**ESTUDIO MORFOLOGICO DE LOS TUMORES INDUCIDOS EXPERIMENTALMENTE
CON METIL NITROSUREA EN LA RATA**

Departamento de Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

58/84

© Adela Pelayo Alarcón

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-10312-1984

AUTOR: DOÑA ADELA PELAYO ALARCON

TITULO: "ESTUDIO MORFOLOGICO DE LOS TUMORES INDUCIDOS EXPERIMENTALMENTE CON METIL-NITROSUREA EN LA RATA"

DIRECTOR: DON AGUSTIN BULLON RAMIREZ
DOÑA JULIANA FARINA GONZALEZ

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID 1982.



HOSPITAL CLINICO DE SAN CARLOS
DE LA
FACULTAD DE MEDICINA
MADRID - 3

DON AGUSTIN BULLON RAMIREZ CATEDRATICO DE ANATOMIA PATOLOGICA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE MADRID Y DOÑA JULIANA FARINA
GONZALEZ AGREGADO DE ANATOMIA PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE MADRID,

CERTIFICAN: que la presente Tesis Doctoral, original de Doña
Adela Pelayo Alarcon, "ESTUDIO MORFOLOGICO DE LOS
TUMORES INDUCIDOS EXPERIMENTALMENTE CON METIL-
NITROSUREA EN LA RATA" ha sido realizada bajo
nuestra direccion y reúne los requisitos para la
obtencion del grado de Doctor.

Madrid nueve de Julio de mil novecientos ochenta
y dos

LOS DIRECTORES

Harinaux.

Agustin Bullon

A mis padres
A mi marido.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
JUSTIFICACION Y PROPOSITOS.....	III
INTRODUCCION.....	1
A) CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL QUIMICA.....	8
B) CLASIFICACION DE LOS CARCINOGENOS QUIMICOS.....	13
C) MECANISMO DE ACCION DE LOS CARCINOGENOS QUIMICOS.....	19
D) ASPECTOS GENERALES DE LA CARCINOGENESIS QUIMICA.....	27
1) Especie animal	27
2) Organoespecificidad de los carcinogenos.....	29
3) Tiempo de latencia.....	30
4) Dosis del carcinogeno.....	31
5) Via de administracion.....	33
6) Edad	35
7) Dieta y habitos nutritivos.....	36
8) Sexo y status hormonal.....	39
E) QUIMICA GENERAL DE LOS COMPUESTOS NITROSOS.....	41
1) Caracteristicas quimicas de la MNU.....	43
2) Obtencion de la MNU.....	45
F) CARCINOGENESIS DE LOS COMPUESTOS NITROSOS.....	46

MATERIAL Y METODO.....	62
RESULTADOS.....	72
A) SERIE A-I.....	73
1) Animales que desarrollaron tumor en cavidad abdominal.....	74
2) Animales que desarrollaron tumor en cavidad craneal.....	77
3) Animales que desarrollaron tumor en sitio distinto de cavidad abdominal y craneal.....	79
4) Animales que desarrollaron dos o mas tipos tumorales.....	80
5) Animales que no desarrollaron tumor.....	81
6) Estudio Estadistico.....	81
7) Iconografia.....	91
B) SERIE A-II.....	151
1) Animales que desarrollaron tumor en cavidad abdominal.....	152
2) Animales que desarrollaron tumor en cavidad craneal.....	154
3) Animales que desarrollaron tumor en sitio distinto de cavidad abdominal y craneal.....	155
4) Animales que desarrollaron dos o mas tipos tumorales.....	158
5) Animales que no desarrollaron tumor.....	159

6) Estudio Estadístico.....	159
7) Iconografía.....	168
C) SERIE B-I.....	212
D) SERIE B-II.....	216
1) Estudios estadísticos.....	218
2) Iconografía.....	223
DISCUSION.....	231
SERIE A-I.....	232
1) CON RESPECTO A LA RESPUESTA TUMORAL.....	232
2) SOBRE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.....	237
a) De los tumores nerviosos perifericos.....	237
b) De los tumores nerviosos centrales.....	239
c) Sobre las características ultraestructurales.....	241
3) SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES	
ALCARCINOGENO.....	245
SERIE A-II.....	248
1) CON RESPECTO A LA RESPUESTA TUMORAL.....	248
2) SOBRE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	
DE LOS TUMORES DESARROLLADOS.....	253
a) De los tumores nerviosos periféricos.....	253
b) De los tumores nerviosos centrales.....	254
c) Sobre las características ultraestructurales.....	257
3) SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES	
AL CARCINOGENO.....	258

CONCLUSIONES.....	260
BIBLIOGRAFIA.....	268

Agradezco al Profesor Don Agustín Bullón Ramírez Catedrático de Anatomía Patológica la dirección y posibilidad de realización del presente trabajo, y haber despertado mi vocación universitaria.

A la Profesora Doña Juliana Fariña González Agregado de Anatomía Patológica a la que debemos la orientación y enseñanza diaria durante muchos años. También quiero manifestarle mi más profundo agradecimiento por la comprensión que ha manifestado en los momentos de desánimo y dudas.

Estoy igualmente en deuda con los Profesores Don Antonio Cardesa García y Don Felipe Llanes Menéndez por su desinteresada orientación y colaboración inestimable. Al Dr. Don Vicente Furio Bacete quiero expresarle mi agradecimiento por el apoyo prestado en el campo de la microscopía electrónica y el interés que tomo en el asesoramiento de la misma.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Doña Paloma Aragoncillo Ballesteros por su colaboración en la realización de esta Tesis y soportar de forma admirable los momentos difíciles de la misma.

Por su colaboración en la realización técnica de la presente Tesis tengo que mostrar mi agradecimiento a los Drs. Doña María Luisa Blanco, Doña Margarita Gimeno, Doña Luisa Cohen y Don José Moran, así, como a la Sta. Anabel Padierna.

A las Stas. Ramona Bustos, Paquita Garcia, Maria Antonia Esteban y Don Celestino Medina mi agradecimiento por la ayuda tecnica prestada que ha hecho posible la finalizacion del presente trabajo,

Por ultimo quiero expresar mi agradecimiento a la Fundacion Cientifica de la Asociacion Española contra el cancer por proporcionarme de una forma desinteresada una extensa recopilacion bibliografica.

A todos ellos y todos mis compañeros de la Catedra de Anatomia Patologica mi mas profundo agradecimiento.

JUSTIFICACION Y PROPOSITOS

Desde nuestra epoca de estudiante de cuarto de Medicina, tuvimos la intencion de dedicarnos a la Anatomia Patologica y nos dirigimos como alumna interna adcritas a la Seccion dirigida por la Profesora Juliana Fariña, ella nos indico como importante tema en la patologia humana la carcinogenesis. Dicho estudio nos parecia apasionante, si bien, era preciso que adquirieramos conocimientos basicos y generales de toda la Especialidad previamente a iniciarnos en la investigacion sobre dicha patologia. Para ello, una vez conseguida plaza por el examen anual MIR decidimos realizar los cuatro años de la Residencia en el Departamento de Anatomia Patologica del Hospital clinico donde se estaban efectuando trabajos sobre carcinogenesis quimica cocordinados por la Profesora Fariña. El modelo experimental seguido era la induccion de tumores con derivados nitrosos del grupo de la urea, que aunque conocida por numerosos autores tenia una serie de hallazgos expuestos en la literatura en principio contradictorios. Asi, segun los trabajos de Druckrey, Pour, Mohr, Koesnert etc la MNU induce tumores de estirpe neuroectodermica principalmente. Estos hallazgos son opuestos a afirmaciones de otros investigadores como Kelly, Plefferoth, Vasilieva, Haas etc, en los que se asevera que tambien se originan tumores de otra estirpe como rabadomiosarcomas, sarcomas, carcinomas etc. Nosotros pensamos que el estudio mediante numerosos cortes multiseriados asi como el estudio con metodos especiales llegando

hasta la M.E. quizás pudiera dilucidar o armonizar estas divergencias.

Por otra parte habia afirmaciones como la de DRuckrey y Koesnert, en las que se decia que la supervivencia de los animales en los que se habian presentado tumores perifericos era menor que la presentada por animales que desarrollaban tumores en el sistema nervioso central. Estos estudios no tenian una confrontacion estadistica que creiamos necesario.

1

INTRODUCCION

Es seguro que el cáncer es tan antiguo como la humanidad misma, y es muy probable que haya estado con nosotros la mayor parte del período evolutivo sobre la tierra. Han sido descritos por paleopatólogos lesiones neoplásicas en restos de huesos de dinosaurios antes de la aparición del hombre sobre la tierra.(25). Los antiguos egipcios conocían la existencia del cáncer, y en las autopsias realizadas a momias se ha demostrado la presencia de tumores óseos.

En el siglo IV antes de C., ya había sido descrito el cáncer de estómago y de útero, y fue Hipócrates quien acuñó el término de carcinoma; Galeno distinguía entre "tumores según natura" y "tumores extra natura". Los principios de Galeno se mantuvieron hasta el siglo XIX, época a partir de la cual se comenzaron a realizar estudios experimentales sobre el cáncer.

Bichat (26), fue el primero en apuntar que se trataba de una formación accidental de un "tejido" cualquiera. Müller (177), posteriormente, demostró que el cáncer estaba constituido por células. A partir de aquí se hicieron más extensos los estudios sobre cáncer, ampliándose los conocimientos sobre el mismo en esta época, sobre todo debido a Rudolf Virchow, quien fue el primero en poner de manifiesto la relación entre irritación crónica y algunos tipos de tumores malignos.

Por entonces se comenzaron a formular diversas teorías patogénicas sobre el cáncer, alguna de las cuales todavía es mantenida hoy día. En general las hipótesis formuladas entonces

pueden resumirse en tres:

A) Hipótesis de irritación

Como ya se apuntó anteriormente, fue puesta de manifiesto primeramente por Virchow (269). Está basada en hechos empíricos que muestran la relación existente entre cánceres desarrollados en sitios sometidos a irritación mecánica como cicatrices, en los labios de los fumadores de pipa, en las zonas estenosadas del tubo digestivo, donde los alimentos pasan con dificultad, etc. Esta teoría defendía que las células normales se transformaban en células cancerosas bajo los efectos de la irritación mecánica.

B) Hipótesis embrionaria

Julius Connheim (52) propuso en 1877, la teoría del "residuo embrionario" para el cáncer. En esencia defendía que las células cancerosas existen ya durante la vida embrionaria. Connheim pensó que los cánceres se producían a partir de restos de células que conservan sus caracteres embrionarios, o bien a partir de masas de tejidos desplazados de su evolución normal, durante el desarrollo.

Esta teoría fue asumida por numerosos autores, y quizá el ejemplo que habla más en favor de la misma sea que ciertos nevus cutáneos, como el pigmentado congénito gigante, que suelen estar presentes desde el nacimiento y en algunos casos se transforman en cancerosos (136). Otro ejemplo lo constituirían cánceres que aparecen en el adulto como algunos teratomas que tienen en su constitución tejidos embrionarios.

Una contrapartida de esta hipótesis, fue postulada por Ribbert (224) en 1896, quien consideró que la aparición del cáncer podría deberse a "desplazamientos" celulares en el sentido de que las células normales se modifican y adquieren la propiedad de proliferar exageradamente de forma análoga a la conducta de las células embrionarias. Para Ribbert uno de los factores más importantes en el desarrollo de tumores, se basaba en que las células perderían la influencia de la tensión tisular. Dicha tensión, en condiciones normales, supondría un freno a la proliferación indefinida.

C) Hipótesis parasitaria

Como consecuencia de los amplios avances en el conocimiento de las enfermedades infecciosas en el siglo XIX, por Pasteur principalmente, Doven (203) propuso un origen infeccioso del cáncer. Este autor describió el "micrococcus neoformans", aislando-lo en varios tumores, e infirió que sería el causante de todos los tipos de cáncer; más tarde se demostró que se trataba de un estafilococo (25). Esta hipótesis perdió pronto su credibilidad; sin embargo, en el siglo XX se reconoció la existencia de agentes transmisibles, cuando en 1908 (43) se demostró que la linfomatosis visceral de las gallinas se transmite de un animal a otro, y también en 1909 el contagio de la verruga humana.

En 1911, Peyton Rous (231) demostró que el sarcoma espontáneo de las gallinas puede transmitirse a otros animales inoculando un filtrado de células tumorales. Fue el virus del sarcoma de Rous el primer virus que se clasificó como agente etiológico de un tumor.

En esta centuria la investigación sobre el cáncer y el desarrollo de los estudios biológicos, han ido cogidos de la mano surgiendo en cada momento hipótesis patogénicas del primero, conocidas como teorías celulares, coincidentes con los hechos biológicos que hayan despertado más interés en el momento; se tardó más de medio siglo en aceptar que el cáncer es una enfermedad multifactorial, siendo muy difícil establecer una correspondencia entre un tipo de cáncer y un factor determinado.

Así, se consideró que la transformación cancerosa es debida a una alteración celular, y aunque los avances de la biología molecular no han dado todavía la llave para la comprensión del cáncer, no hay que dudar que han dado numerosas aportaciones para la explicación del fenómeno. Hoy día esta en voga la genética molecular, y a ésta se le ha hecho responsable del fenómeno canceroso; hecho basado en la esencia misma de la célula cancerosa, que consiste en crear una población de células idénticas a ella misma; en este sentido el cáncer sería una enfermedad "hereditaria".

Al mismo tiempo de formularse las diversas teorías etiopatogénicas sobre el cáncer, se iniciaron los primeros trabajos en oncología experimental.

Los primeros trabajos sobre cancerología experimental, se remontan a la segunda mitad del siglo XIX, en el que se realizaron intentos para trasplantar trozos de tejidos cancerosos de un animal a otro. La mayoría de estos experimentos fracasaron,

como hoy sabemos, consecuencia de una respuesta inmunitaria de rechazo por parte del huesped. En 1775, un médico francés, Bernard Perylhe, fue el primero que realizó trasplante de tumores humanos espontáneos a perros, e indicaba que se inducían nuevos crecimientos; sin embargo, estos crecimientos probablemente no eran verdaderos tumores, sino la mayoría de las veces abscesos (25).

El primer éxito de trasplante tumoral se remonta al año 1875 por Novinsky con un sarcoma de perro (192).

En 1894, Moreau hizo uno de los estudios más serios en este campo transplantando tumores entre ratones y obteniendo muy buenos resultados (133).

Paralelamente, se comenzaron a realizar trasplantes de tejidos embrionarios sobre animales adultos, observándose que aquellos presentaban una mayor capacidad proliferativa que los tejidos maduros, llegando a la conclusión que cuanto más joven es el embrión mayor es la multiplicación celular.

En muchos tumores que resultaron ser trasplantables se ha sabido que el componente activo que se transfería, no eran las células efectivas, sino un virus; así, en 1909 (282) se observó que la verruga común del hombre era trasplantable y su componente activo fue demostrado en extractos libres de células. Poco después se demostró que esto también se daba en una leucemia en aves, y en un sarcoma de pollo (282).

La investigación sobre cáncer presentó una nueva vía cuando se iniciaron los trabajos de producción experimental del mismo. La carcinogénesis experimental puede realizarse de formas muy diversas, como es con la acción de RX, calor, sustancias químicas, etc. Sin embargo, desde el momento inicial de la primera observación por Sir Percival Pott (206) de la presencia de tumores en los deshoollinadores, y Hill (108) de tumores nasales en los individuos que tomaban rapé, hasta la inducción tumoral en animales, pasaron muchos años. Esto fue debido básicamente a no elegir la especie adecuada o el modo de administración, o interrupción precoz del experimento.

En el apartado siguiente, nos detendremos en la exposición de la carcinogénesis experimental química, dado que nuestra labor se desarrolla en este campo.

CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL QUIMICA

La carcinogénesis experimental, comenzó a desarrollarse como tantas otras ramas del saber científico, en un hecho de observación.

Cuando la observación de Sir Percival Pott en 1775 (206) relacionó la alta incidencia de cáncer de escroto entre los adultos que habían sido deshollinadores en su infancia y atribuyó la alta incidencia de este tipo de cáncer con un prolongado contacto con el hollín, se determinó de alguna forma un agente etiológico productor del cáncer (el hollín) que posteriormente fue utilizado para producir experimentalmente el mismo. La siguiente relación que se estableció entre una ocupación y el desarrollo de un tipo de cáncer, fue dada por Von Volkman en 1875, en los trabajadores expuestos a productos de alquitran (270).

Renke en 1907 (223) es el iniciador del llamado "cáncer químico" quien tras inyección de éter al 3% en el ojo de salamandra indujo una proliferación epitelial atípica que trasplantada al peritoneo de otras salamandras continuaba proliferando hasta producir un carcinoma.

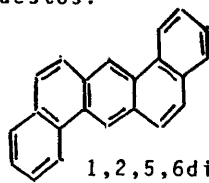
También se demostró que el empleo de agentes químicos liposolventes eran capaces de producir carcinomas en los sitios de aplicación. Así Stoeber y Wacker en 1910, demostraron que el rojo escarlata y el sudan III en solución al 5% de nido y escatol, producen proliferaciones epiteliales semejantes a carcinomas.

Un hito importante fue el marcado por los patólogos japoneses Yamagiwa e Ichikawa en su trabajo "Estudios experimen-

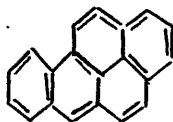
tales sobre la proliferación epitelial atípica", quienes en 1915, aplicando repetidamente pinceladas de alquitrán a las orejas de conejos, produjeron tumores cutáneos, en un principio benignos, y más tarde malignos. Este mismo experimento se demostró en la piel del ratón.

Aunque el descubrimiento de la carcinogénesis química supuso que pronto se conocería la naturaleza de los tumores, han pasado muchos años y aún estamos lejos de ellos.

En los años siguientes y basados en estos experimentos, se acometió el esfuerzo de identificar los componentes activos y naturaleza de los mismos, que contenidos en el alquitrán y hollín, eran responsables de la acción carcinogénica. En 1925, Kennaway (123) demostró que compuestos orgánicos simples, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos purificados del alquitrán, eran carcinógenos. En 1930 (Kennaway (122) sintetizó los dos primeros carcinógenos puros, de ellos el 1-2-5-6 dibenzantraceno y el 3-4 benzopireno. Dos años después Cook (55) consigue el primer cáncer experimental aplicando el primero de los compuestos.



1,2,5,6dibenzantraceno .



3-4 benzopireno

Los hidrocarburos policíclicos varían en su potencia carcinogénica, siendo uno de los carcinógenos más potentes el 3-metilcolantreno.

Conforme se iban extrayendo más compuestos y realizando estudios para determinar la estructura molecular específica responsable de la acción carcinogénica, se llegó a la conclusión de que los elementos más carcinogénicos eran los hidrocarburos "planos"; sin embargo, se ha demostrado (203) que el carácter plano no es indispensable para la acción carcinogénica. Se descubrieron otras clases de carcinógenos, así como las relaciones químicas y fisiológicas entre las hormonas sexuales y los derivados del alquitrán. Se utilizó la estrona aislada de la orina de la embarazada para producir carcinomas en tejidos como la mama y el ovario. El tetrahidrofenantreno, un derivado del alquitrán utilizado por Cook en 1935 (54) produjo acciones similares a la estrona.

En 1935 Sasaki y Yoshida (236) abrieron un nuevo campo en la carcinogénesis química al alimentar ratas con el colorante azoico amino-azotolueno y producir tumores hepáticos. Este colorante a diferencia de los hidrocarburos policíclicos, no actúa en el lugar de contacto del agente con el organismo, sino a través de complejas vías metabólicas. Otros carcinógenos que actúan en un lugar remoto al de su administración, son entre otros, el 2-acetilaminofluoreno, y el etil-carbamato. Este último, fue utilizado en la terapéutica antes de conocerse su acción cancerígena.

Otro grupo de sustancias que tienen importancia en la producción de cánceres experimentales, son los que se conocen

como agentes alquilantes, cuya característica reside en la cesión de grupos metilos a los ácidos nucleicos; dentro de este grupo hay que destacar las nitrosaminas. La nitrosamina más simple es la dimetilnitrosamina (DNM) cuya acción tóxica y carcinogénica fue descrita por primera vez por Magee y Barnes en 1954 y 1956. Este compuesto tiene gran actividad carcinogénica para el hígado y riñón de los roedores; su toxicidad hepática se demostró cuando la dimetilnitrosamina fue introducida en la industria como disolvente. Dentro de la acción carcinogénica de estos compuestos es de destacar su organotropismo, demostrándose además en ellos por primera vez, su mecanismo de acción a través de la alteración del DNA. Dado que los componentes utilizados en este trabajo pertenecen a este grupo de sustancias químicas, su exposición la realizaremos más ampliamente en capítulos posteriores.

Además de estos agentes químicos, se ha demostrado que ciertos compuestos inorgánicos poseen acción carcinogénica, como son el níquel, el berilio, arsénico, etc. (286).

Muchos otros carcinógenos han sido descritos y utilizados, pero el mecanismo básico de la carcinogénesis permaneció desconocido hasta hace unos 30 años, en que se dió el primer paso al sugerirse que muchos de los carcinógenos no serían peligrosos por ellos mismos, sino porque en el organismo se transforman en compuestos más activos (Boylard en 1947). Se admite en general, que la mayoría de los carcinógenos químicos actúan

tras sufrir alguna transformación metabólica o activación del tumor. Así por ejemplo, en el caso de dibenzantraceno, la activación parece consistir en la oxidación de uno de sus dobles enlaces. Esta oxidación sería producida por enzimas microsomales que existen en el hígado. Una vez producida la conversión, los hidrocarburos se fijan al DNA, RNA y proteínas, observándose que la fijación con el DNA está en relación con el poder carcinógeno (140). (146). (170)

CLASIFICACION DE LOS CARCINOGENOS QUIMICOS

Weisburger en 1976 (280) clasifica a los carcinógenos según su mecanismo de acción y establece que existen tres tipos de carcinógenos químicos.

- A) Carcinógenos directamente activos.
- B) Carcinógenos que deben ser previamente metabolizados.
- C) Carcinógenos naturaleza que alteran los alimentos.

A) Carcinógenos directamente activos

Son aquellos que no necesitan de transformación metabólica alguna para ejercer su acción. Al no precisar de metabolitos intermedios, actúan con gran rapidez, dificultando considerablemente su detección in vivo, y además, el desarrollo tumoral se lleva a cabo en el lugar de implantación del carcinógeno.

El mejor método para determinar si un carcinógeno es directo, consiste en realizar la aplicación subcutánea del mismo, esta vía incluye efectos locales y de absorción, si se desarrollan tumores locales indicaría que el carcinógeno es directo. De este punto hablaremos más detenidamente al tratar de las características generales de la carcinogénesis química.

Dentro del grupo de los carcinógenos directamente activos encontramos los alquilantes y los arsenicales.

Los alquilantes son sustancias ampliamente extendidas en la farmacopea antineoplásica (mostaza nitrogenada, ciclofosfámidas, melfalan etc.); son capaces de introducir uno o más

radicales alquilos en una molécula, y casi todos actúan impidiendo la reduplicación celular al establecer puentes de unión entre el nitrógeno 7 de la guanina de ambos haces helicoidales de DNA (Estape y cols. en 1975) (78). Lo mismo que impiden la reduplicación celular puede ser que como consecuencia de un efecto reparador de las células se produzca una diferenciación anómala con transformación neoplásica (78).

Los arsenicales:- Se admite su acción directa aunque se sospecha que tengan etapas metabólicas intermedias. También Regelson et al. en 1968 (220) demostró su acción carcinogénica para el hombre.

Otras sustancias que se pueden incluir en este grupo de carcinógenos directamente activos son el níquel y el amianto (Sunderman, 1971) (256)

B) Carcinógenos que deben ser metabolizados

La mayoría de los carcinógenos químicos se encuentran en este grupo, y, en general, se van a caracterizar porque han de sufrir una transformación metabólica en el organismo, siendo sus metabolitos los responsables de la acción carcinogénica. La activación metabólica va a depender de factores diversos que analizaremos posteriormente y que pueden ser los relativos al sexo, especie, nutrición, edad, etc.

De este grupo de carcinógenos citaremos los que a nuestro juicio consideramos más importantes para establecer relación con algunos hechos del presente trabajo.

1) Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Los mejor conocidos son el benzantraceno, metilcolantreno, dibenzantraceno y benzopireno. La historia de la investigación del cáncer está íntimamente ligada a estos compuestos, los cuales forman parte de diversos productos ambientales como el hollín, petróleo, humo de tabaco, etc.

Con el empleo de estos carcinógenos en la inducción cutánea de cánceres, se determinó que la carcinogénesis química es un proceso que consta de dos etapas (Berenblum, 1947) (21). En la primera, los hidrocarburos policíclicos actuarían iniciando un proceso que va seguido de cambios irreversibles a nivel celular, pero reversibles en cuanto a desarrollo tumoral; esta primera etapa Berenblum la denomina de "iniciación". En un segundo periodo, las células dañadas se pueden malignizar irreversiblemente de dos formas, por aplicación repetida del hidrocarburo periódicamente, como en la experiencia de Yamagiwa e Ichikawa (288), o bien si sobre la célula ya dañada actúan otros agentes distintos a los de la primera aplicación. Berenblum comprobó que sustancias que no eran en sí carcinogénicas, pueden estimular la carcinogénesis en esta segunda etapa a la cual denominó de "promoción".

2) Aminas aromáticas: Su conocimiento se remonta a los inicios de la cancerología experimental en el siglo XIX, al iniciarse las descripciones de cáncer de vejiga urinaria en los obreros que usaban colorantes del tipo de la anilina.

Estas sustancias se encuentran muy extendidas en el mundo de la industria, siendo además característicos de ellas que debido a que necesitan sufrir una activación metabólica para ejercer su acción carcinogénica, no suelen producir cáncer en el lugar de aplicación o de contacto, sino que actúan a distancia. En su mayor parte suelen tener un intenso organotropismo por el conducto urinario (Walpole, 1958; Bonser, 1956; Clayson, 1953) (48, 30, 271). Las aminas aromáticas más peligrosas para el hombre son: la naftalina, la benzidina, la magenta, la auramina y la xenilamina. En estos compuestos se ha demostrado que los niveles altos de vitamina B6, reducen la excreción urinaria de diversos metabolitos de las aminas aromáticas, y por consiguiente, disminuye su acción carcinogénica (Morris et al. (1963) (174).

3) Colorantes azoicos: El descubrimiento de dichas sustancias como carcinógenos, han supuesto un importantísimo avance en el conocimiento de la etiología del cáncer. Fueron utilizados primeramente por Sasaki y Yoshida en 1935 (236), quienes indujeron tumores hepáticos experimentalmente al alimentar ratas con el colorante azoico o-aminoazotolueno y fueron los primeros carcinógenos químicos en los que se demostró una acción a distancia del lugar de aplicación. Por lo general, a nivel experimental suelen provocar hepatomas en la rata y cáncer de vejiga urinaria en el perro. Además, es en estas sustancias donde con más intensidad se ha estudiado la influencia de la dieta sobre la carcinogénesis química, al observar que los animales de

experimentación no desarrollan cáncer si la dieta que reciben es muy rica en proteínas y vitaminas, principalmente riovoflavina B2 (Amilay, 1968) (12).

4) Nitrosaminas o N-Nitroso derivados: Magee y Barnes en 1956 (143) describieron por primera vez la acción carcinogénica de estas sustancias, al producir hepatomas en animales de experimentación en cuya dieta se había añadido la dimetilnitrosamina. Se descubrió que estos compuestos químicos son carcinógenos, prácticamente para todo el reino animal, constituyendo un medio idóneo para el estudio de la problemática de la carcinogénesis química.

De las características de estos compuestos, que son objeto del presente estudio, nos ocuparemos más adelante.

5) Otros compuestos que también se incluyen en este grupo son las hidracidas, el uretano, tioacetamida y el cloroformo, sus características químicas son bien diferenciadas de las nitrosamidas objeto del presente trabajo.

C) Carcinógenos naturales que alteran los alimentos

Dentro de este grupo los más conocidos son: las aflatoxinas, que son unos metabolitos fúngicos extraídos del *aspergillus flavus*, y que en medio húmedo contaminan los grandes acumulos de maíz y de cacahuets. La aflatoxinas son muy tóxicas incluso en pequeñísimas concentraciones, y su capacidad carcinogénica la desarrolla sobre todo a nivel hepático (Mc Lean, 1971) (154). (4).

Derivados de plantas: en algunas regiones utilizan el *Heliotropum*, *senecio* y *crotolaria* en infusiones semejantes al té. Estas plantas poseen unos alcaloides pirroizidínicos que se ha comprobado que producen hepatomas malignos en la rata, y su empleo por el hombre se asocia a cáncer de esófago (Martan, 1969) (152).

Los ciclamatos son edulcorantes muy difundidos y es capaz al darse por boca de producir carcinoma de vejiga en la rata. La acción de la sacarina como carcinógeno, no esta determinada y más bien parece que su acción es como co-carcinógeno.

El safrol es un producto natural que además ha sido utilizado como aditivo de alimentos. Dicho compuesto es capaz de producir cáncer en ratas cuando se administra a altas dosis en periodos largos de tiempo (Weisburger and Williams, 1975) (279).

MECANISMO DE ACCION DE LOS CARCINOGENOS QUIMICOS

Una de las teorías propuestas para explicar la iniciación y el desarrollo del proceso de carcinogénesis, presupone la unión del carcinógeno a ciertas proteínas plasmáticas, DNA y RNA celular (139,164,170).

Los estudios iniciales a este respecto fueron los realizados por E. Miller y J.A. Miller en 1947 (155), al observar que los colorantes aminoazoicos utilizados como hepatocarcinógenos, se encontraban firmemente unidos a las proteínas de la célula hepática. En 1952 los Miller (157), demostraron que un metabolito del 2-acetilaminofluoreno, el N-Hidroxi, era más carcinógeno que el compuesto inicial; además observaron que ciertos animales como el cobayo que no pueden convertir el 2-acetilaminofluoreno en N-Hidroxiaminofluoreno, no sufrían cáncer al alimentarlos con el compuesto original. Al menos en este ejemplo, se demostró que el compuesto inicial no tiene acción carcinogénica directa, y son ciertos metabolitos producidos en el organismo, los responsables de la inducción del cáncer. Según estos estudios, la mayoría de los carcinógenos químicos deben ser metabolizados en las células para que ejerzan su actividad carcinogénica. Esto podría explicar por qué una sustancia es carcinogénica para una especie y no para otras.

Heidelberger en 1956 (101) defiende también la unión previa de los carcinógenos químicos a ciertas proteínas celulares como paso primero para la iniciación de la carcinogénesis.

Weisburger y Weisburger (276) en 1958, confirman el mismo fenómeno descrito por los Millers, empleando el 2-acetilamino-fluoreno, cuya estructura química y acción carcinogénica es diferente a la de los colorantes aminoazoicos. Sorof en 1958 (247) mediante técnicas especiales demostró esto mismo, y además, que dichas proteínas aumentaban extraordinariamente en los estadios iniciales de la carcinogénesis, y que los hepatomas producidos no poseían dichas proteínas.

Miller y Miller postulan en 1952 (157) postulan la "hipótesis de supresión o de eliminación". Tal hipótesis considera la existencia de proteínas intracelulares específicas, que de alguna forma regulan el crecimiento normal celular, y que los carcinógenos o sus metabolitos se unen a dichas proteínas, inactivándolas o destruyéndolas de forma irreversible, de esta forma las células hijas de las divisiones subsiguientes estarían carentes del control de crecimiento y maduración celular; estas células, por definición, serían células cancerosas.

La metabolización y unión del carcinógeno a estructuras nucleares, ha sido demostrada por otros autores. En el año 1962 Marroquin y Farber (151) demostraron "in vivo" la incorporación del 2-acetilaminofluoreno radiactivo al ácido nucleico de las células hepáticas. En 1966 Sporn y Dingman (248) reportaron la diferencia que existe "in vivo" en lo que respecta a la unión e interrelación de 2-acetilaminofluoreno y el 3-metilcolantreno con el ácido dextrirribonucleico de la célula hepática.

Gutman y cols. en 1966 (93) demostraron que los ácidos arilhidroxámicos derivados de las amidas aromáticas, son más carcinógenos que las amidas de donde se derivan, de esta forma se demostró la importancia de la hidroxilación en la formación de un completo molecular con mayor actividad carcinogénica que su precursor.

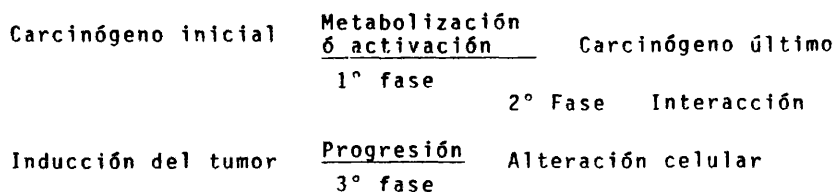
Más recientemente Stora en 1980 (252) con el empleo de técnicas de fluorescencia ha identificado la presencia de carcinógenos unidos a la molécula de DNA celular.

Millers y Millers en 1966 (159) establecieron una similitud entre los mecanismos de acción de los carcinógenos químicos y la carcinogénesis producida por virus, de tal forma, que los mecanismos que provocan una alteración en la información genética de la célula debido a las interacciones químicas, son los mismos mecanismos que los producidos por virus, en los que una nueva información genética se introduce a la célula invadida por el virus. De acuerdo con esto, Horsfall en 1963 (115) propuso una hipótesis unitaria o teoría general de la carcinogénesis.

El carcinógeno no sólo sería capaz de unirse a proteínas, sino también al ADN, RNA y otras macromoléculas, siendo la unión con el DNA la responsable de la transformación cancerosa (Miller and Miller, 1966) (159). Así, Brooker y Lawley en 1964 (37), al estudiar la carcinogenicidad de varios hidrocarburos aromáticos, demostraron que la potencia de carcinogénesis estaba en relación con su propensión a unirse con el DNA. Desde entonces, la mayoría

de las observaciones sugieren que los carcinógenos químicos ejercen sus efectos por una interacción directa entre la sustancia activa y el DNA celular, capaz de condicionar una mutación en las secuencias de las bases del DNA. A su vez, esta mutación es capaz de transmitirse de una generación celular a otra. Esto además, se apoya en que muchos de los carcinógenos han resultado ser poderosos mutágenos (Popuzianz, 1973) (205), (Yano and Isobe, 1979) (290), (Modhizuki et al. 1979) (164), (Ames et al. 1973) (11). Así, por ejemplo, se acepta que el modo de acción de las aminas aromáticas es en el DNA especialmente a nivel de la guanina, y que sustituyendo al átomo de nitrógeno en su estructura, se altera su acción carcinogénica (Miller, 1970) (160).

En general la mayor parte de los carcinógenos químicos sufren una transformación metabólica en el organismo produciendo un producto activo que se llama "carcinógeno último" (21), a diferencia del carcinógeno inicial que se llamaría carcinógeno indirecto. Todo esto lo podemos resumir en el siguiente esquema modificado de Golberg y Phil, 1973): (87)



Dentro de la carcinogénesis experimental, uno de los hechos más característicos es la existencia de un tiempo variable entre la aplicación del carcinógeno y la aparición del cáncer.

Apoyado en esto, Berenblum en 1947 (21) sugirió que el proceso de carcinogénesis puede separarse en dos estadios distintos, de "iniciación y promoción" respectivamente.

En el estadio de iniciación tumoral de Berenblum, se produciría un cambio irreversible a nivel celular, siendo después el estadio de promoción el responsable de la expresión de este cambio tumoral. Aunque estudios realizados por Roe y cols. en 1972 (228) parecen indicar que la iniciación puede ser reversible, lo que sí es seguro es que el primer paso se identificaría con la acción mutagénica del carcinógeno, siendo los carcinógenos más mutagénicos los más iniciadores.

El mecanismo de la "promoción" tumoral es más oscuro, pero sabemos que puede ser modificado por factores ambientales, incluyendo edad, sexo, dieta, hormonas, etc. (Franks, 1974) (82) (Berenblum, 1974) (21). Este concepto en dos estadios en la carcinogénesis, se admite que es muy relevante en la carcinogénesis humana.

Antes de seguir adelante creemos conveniente exponer algunos conceptos desde hace tiempo ya aceptados, y que ayudan a comprender la problemática del mecanismo de la carcinogénesis; esto nos lleva de la mano a definir la "co-carcinogénesis". El término co-carcinógeno fue introducido por Shear en 1938 (243), y estudiado ampliamente por Berenblum en 1941 (20), Mottram en 1944 (176), Hecker en 1977 (99). En 1976 Roe (227) define el carcinógeno como el agente capaz de provocar el desarrollo de

cánceres que no se hubieran producido sin su influencia, a diferencia del co-carcinógeno que sería un agente que aumenta el riesgo para algún tipo de cáncer, pero que "per se" es dudosa su acción carcinogénica. El co-carcinógeno sólo provoca tumores si su aplicación va precedida o seguida de la exposición a un carcinógeno. Los co-carcinógenos pueden ser exógenos y endógenos, los exógenos suelen provenir de la industria, derivados del alquitrán, parafina, detergentes, alcohol, etc. (Schottenfeld, 1962) (241).

De los endógenos, el mejor ejemplo lo proporcionan las hormonas (Clifton and Sridharan, 1975) (50), (Fucrth, 1951) (84) (Goldfard, 1976) (88).

El mecanismo de carcinogénesis en dos estadios ha sido descrito principalmente en cánceres cutáneos, pero existen ejemplos análogos en otros tejidos. Peraino en 1973 (201), utilizando el acetilaminofluoreno en periodos cortos y a pequeñas dosis en la alimentación de las ratas, vió como al cabo de las 3 semanas se eliminaba y se producía muy pocos tumores. Pero si una vez eliminado el carcinógeno se añade fenobarbital a la dieta, entonces, prácticamente el 100% de los animales muestran cánceres hepáticos a los 6 meses. Esta claro en la anterior experiencia, que el fenobarbital actuaría como co-carcinógeno en el estadio de promoción tumoral. Otro ejemplo interesante es el del cáncer de vejiga, producido por la N-metil-N-nitrosourea, en el que el promotor co-carcinógeno, en este caso la sacarina, se puede administrar en la dieta antes y después de la adminis-

tracción del carcinógeno (Hicks y cols. 1973) (105) (Cohen, 1979) (51).

Otros ejemplos de carcinogénesis en dos periodos son referidos por Berenblum en 1947, 1964 y 1974 (20), Salmen en 1964 (234) y Becker en 1981 (19). Según estos autores, hemos de distinguir entre agentes que tienen una acción promotora, que son los denominados co-carcinógenos y aquellos que son capaces de producir iniciación y promoción, que son los que se denominan carcinógenos completos.

Estos dos periodos de iniciación y promoción de la neoplasia estarían entrelazados por el fenómeno de progresión de la neoplasia.

Todo esto lo podríamos resumir en el siguiente esquema modificado de Pitot.200

		Progresión	Promoción
Célula normal	<u>Iniciación</u>	Célula iniciada	<u> </u> Cél. neoplásica

Se admite que las alteraciones citopatológicas clásicas están basadas en que la transformación cancerosa de la célula, es el resultado de una alteración genética en la misma. Esta alteración es la respuesta a la afectación nuclear por el carcinógeno. Para algunos, el sistema citosquelético intracitoplasmático de microtúbulos y microfilamentos organizados, desempeñaría un importante papel, para que las células mantuvieran una ordenación espacial específica. Las propiedades de la superficie celular parecen depender en gran parte, de la función del citoesqueleto.

Estas propiedades estan alteradas en la célula cancerosa, sin embargo, no se sabe si el sistema citoesquelético alterado es la causa o el resultado de la alteración genética (Hynes, 1976) (117) (Nikolson, 1976) (182) (Chowdhury and Chou, 1973) (47).

También se han demostrado alteraciones en las propiedades eléctricas de la superficie de la membrana citoplasmática en células sometidas a la acción de agentes químicos carcinogénicos (Chowdhury and Chou, 1973) (47), así como alteraciones en las proteínas de la superficie celular (Lau Bochen et al. 1976) (132), aunque tampoco está claro que estas variaciones sean origen o respuesta de la transformación cancerígena de la célula.

ASPECTOS GENERALES DE LA CARCINOGENESIS QUIMICA

Muchos son los factores capaces de modificar la carcinogénesis química tanto de origen exógeno como endógeno. Haremos en el presente apartado una somera revisión de los más importantes. A menudo, no hablaremos de estos factores de una forma aislada, ya que sus acciones se pueden relacionar entre sí, por lo que tendremos que hacer su exposición conjunta.

ESPECIE ANIMAL

Desde los comienzos de la cancerología, se sabe que existen especies que muestran con mayor preferencia por un tipo determinado de tumor, o bien, que son más susceptibles a la acción de diversos agentes carcinógenos. Sin embargo, como luego veremos es posible variar la susceptibilidad de un animal a un carcinógeno.

Existen carcinógenos como los N-nitrosos que lo son prácticamente para todas las especies estudiadas en mayor o menor grado; pero otros, como la N 2-fluorenilacetamina, que es carcinógena para muchas especies, no lo es para el cobaya ni la rata algodónera, animales que son refractarios a la acción carcinogénica de este compuesto (Miller y Miller, 1971) (161) (Weisburger and Weisburger, 1973) (278). El ratón es más resistente a la acción carcinogénica de 2-acetilaminofluoreno que la rata (Wilson et al., 1947) (283). La 2-naftilamina, causa cáncer de vejiga en el hombre, y es, además, un potente carcinógeno para perros y hamsters, pero no para ratas, ratones ni conejos (Epstein, 1974) (79).

Muchas especies son sensibles a la acción carcinogénica de determinados hidrocarburos, sin embargo, la respuesta a los mismos va a depender de su modo de administración. Así, el ratón, conejo y hamsters, muestran una gran susceptibilidad a los hidrocarburos policíclicos aromáticos administrados mediante pinceladas repetidas en la piel; las ratas y aves son más resistentes a esta acción. Por el contrario, cuando estos mismos carcinógenos se administran por inyección subcutánea, las ratas y aves muestran una intensa susceptibilidad, a diferencia de los conejos que son prácticamente resistentes (Berenblum, 1974) (23).

Los primeros reconocimientos sobre esta selectividad de especie por parte de los carcinógenos, fueron dados por Boyland en 1952 (34) y ampliados por Miller y Miller en 1971 (161) y Brookes y Lawley en 1964 (37), estableciendo estos autores que la susceptibilidad al carcinógeno es debido a diferencias de como cada especie metaboliza ese carcinógeno, pero no a la capacidad mutagénica del mismo: así por ejemplo, el cobaya no es sensible a la acción de la 2-fluorenilacetamida porque es incapaz de producir la N-hidrocilación de este compuesto, necesaria para su transformación en la forma activa (Weisburger and Weisburger, 1973) (278). Sin embargo, va a ser posible variar la sensibilidad de un animal a un carcinógeno, mediante exposición previa a sustancias que no son carcinogénicas (Hicks, 1973) (105) (Peraino, 1973) (201).

ORGANOESPECIFICIDAD DE LOS CARCINOGENOS

Se define la organoespecificidad de un carcinógeno, cuando este produce selectivamente tumores en un determinado órgano, siempre el mismo.

El primer trabajo sobre la organoespecificidad de los carcinógenos químicos se remonta a los trabajos de Yoshida en 1933 (292) y Sasaki y Yoshida en 1935 (236) con el 0-aminoazotolueno, los cuales observaron que su administración por vía oral a las ratas, producía selectivamente tumores hepáticos. Desde entonces, se conoce la organoespecificidad de numerosos compuestos como el 2-acetilaminofluoreno por la vejiga (Bielschowsky, 1944) (27) (Wilson et al. 1947) (283) (Morris et al. 1960) (173). Metil y etil nitrosourea por el sistema nervioso (Druckrey et al. 1965) (64), (Koestner et al., 1972) (127), (Kleihner et al. 1970) (124), (Bullon y cols. 1975) (40). La aflatoxina B1 es el más potente de los agentes hepatocarcinógenos conocidos, capaz de producir tumores hepáticos en roedores, peces, aves y primates (Pitot, 1981) (203).

La organoespecificidad va a depender de varios factores. Así, la estructura química del carcinógeno y sus metabolitos activos, son los responsables de la aparición de la neoplasia. Si el compuesto metabolizado a carcinógeno último, presenta una vida media corta y es muy reactivo, es lógico deducir que la aparición de tumores se producirá en el lugar de implantación, o, proximidades, o en órganos donde se lleva a cabo el metabolismo del mismo. Por el contrario, si su estabilidad es alta y su

vida media prolongada, pueden desarrollarse tumores en uno o varios órganos distintos y alejados (Druckrey, 1967) (66).

Otros factores que modifican la organoespecificidad, son las dosis, tiempo y vía de administración del carcinógeno (Weisburger and Williams, 1975) (279) (Nemoto and Takarama, 1973) (181) (Druckrey et al. 1964) (63) (Druckrey, 1975) (71) (Magee y Barnes, 1967) (145) (Bartch, 1977) (17).

TIEMPO DE LATENCIA

El tiempo de latencia lo definimos como el tiempo transcurrido entre la aplicación de carcinógeno y la aparición de la neoplasia.

El tiempo de latencia y la organoespecificidad son quizá los rasgos más indicativos de la carcinogénesis experimental.

A su vez, este factor, como es lógico pensar, va a estar influido por otros muchos. Así, las características químicas del carcinógeno, la capacidad de absorción del mismo, la vía de administración, la especie animal, su edad y los órganos afectados (Schmahl, 1979) (237), (Schwamahl et al. 1980) (238), (Wilson, 1947) (283), (Berenblum, 1974) (23). Por lo general, en las ratas adultas, especie en la que hemos efectuado el presente trabajo, el tiempo de inducción es corto para los tumores hepáticos y mamarios, y mucho más largo para la aparición de tumores pulmonares y nerviosos. El dibenzantraceno produce sarcomas subcutáneos, tras un período de latencia de cuatro a cinco meses;

el benzopireno necesita menos de cuatro meses, y por último, el metilcolantreno presenta un período de latencia por debajo de los dos meses. Los criterios para la aplicación de estos carcinógenos fueron los mismos (Berenblum, 1974) (23).

DOSIS DEL CARCINOGENO

La relación dosis-respuesta en la carcinogénesis química, va a ser uno de los mayores problemas que se plantean al comparar los resultados de los diversos carcinógenos (Lihlegield, 1980) (139).

Berenblum en 1974 (23) considera: dosis "mínima" a la menor cantidad de carcinógeno capaz de inducir la aparición de un tumor, dosis "efectiva" cuando se manifiestan tumores en aproximadamente el 50% de los animales que reciben el carcinógeno, y dosis "óptima" cuando el 95% al 100% de los animales trabados desarrollan tumor. En general, con respecto a la carcinogénesis química, el número de tumores provocados está en relación directa con las dosis administradas, aunque no hay que olvidar la potencia del carcinógeno ni la susceptibilidad de la especie animal.

En el año 1947 Wilson y cols. (283) publicaron un trabajo en el que comparaban los efectos carcinogénicos del 2-acetilaminofluoreno en relación a su concentración en la dieta y el tiempo de exposición; así, los animales cuya dieta contenía carcinógeno a una concentración de 4 mg/gr. de alimento, desarrollaban tumores entre los 95 y 333 días después de iniciado

el experimento. Si la dieta contenía el carcinógeno en una concentración de 1 mg/gr. de alimento no era suficiente para provocar la carcinogénesis; finalmente si la concentración era de 12'5 mg/gr de alimento, al cabo de los 25 días se desarrollaban tumores. Según estos autores era necesario que la rata hubiera ingerido una cantidad mínima de 300 mg de 2-acetilaminofluoreno en un período de 25 a 100 días consecutivos. Por el contrario, si se administraba de una sola vez 1 gr. de carcinógeno, estos animales no desarrollaban tumores.

Algunos carcinógenos como los hidrocarburos policíclicos, son más activos cuando se administran a pequeñas dosis continuamente, que cuando se administran la misma cantidad de una sola vez (Weisburger and Williams, 1975) (279).

Con referencia a la organoespecificidad en relación con la dosis de algunas nitrosaminas, son conocidos los trabajos de Magee y Barnes de 1962 (144), Magee et al. en 1976 (147), Nemoto and Takayama en 1973 (181), en los que muestran que a dosis bajas repetidas se producen selectivamente tumores de hígado o cerebro, mientras que si se administra en una sola dosis la misma cantidad, se producen tumores renales.

A esta misma conclusión llegan Druckrey et al. en 1967 (67) empleando MNU a dosis pequeñas y repetidas, obteniendo una alta incidencia de tumores nerviosos, sin embargo cuando

su administración es de una sola dosis los tumores que aparecen no muestran selectividad por el sistema nervioso.

VIAS DE ADMINISTRACION DEL CARCINOGENO

Los primeros trabajos a este respecto en los que la vía de aplicación del carcinógeno determina en parte la respuesta tumoral, se remontan a Kennaway en 1937 (123) y Shear en 1938 (243), que comprobaron que la administración de hidrocarburos por vía subcutánea provocaba sarcomas, mientras que su aplicación directa en la piel producía carcinomas y papilomas.

Desde entonces, prácticamente se han ensayado todas las posibles vías de administración; aplicación local, subcutánea, intravenosa, intracerebral, intraperitoneal, trasplacentaria, inhalatoria, oral, rectal, etc. En todos los casos se ha puesto de manifiesto que existe una relación directa entre los efectos carcinogénicos y la vía de administración. Así, en relación con los carcinógenos n-nitrosos, la dibutilnitrosamina induce principalmente tumores en la vejiga urinaria, cuando se inyecta subcutáneamente; por el contrario cuando su administración es por vía oral se producen también tumores hepáticos y pulmonares.

Weisburger and Williams, 1975 (279), Nemoto and Takayama, 1973 (181), defienden esto mismo con relación al empleo de otras nitrosaminas.

Son interesantes también los trabajos de Zimmerman y cols. en 1943 (293) en este campo de la neurooncogénesis química. Dichos autores establecieron una relación entre el lugar de

aplicación del carcinógeno y la aparición de tumores; utilizando diversos hidrocarburos establecieron que los meduloblastomas siguen a la aplicación del carcinógeno en el cerebelo, los ependimomas siguen a la aplicación de carcinógeno en la pared ventricular.

Koestner y cols., en 1972 (127) utilizaron compuestos n-nitrosos por varias vías de aplicación; con la MNU a dosis de 5 mg/kg. hasta un total de 180 mg. obtuvieron que cuando se administraba por vía endovenosa aparecían un total de 97% de tumores nerviosos, por vía oral un 52%, por vía intraperitoneal un 36% y por vía subcutánea un 12%.

Otras de las vías que también se ha investigado es la trasplacentaria (Druckrey et al., 1966) (65), (Druckrey, 1973) (69), (Koestner, 1971) (126), (Mackawa et al. 1977) (142), (Vesselinovith, 1979) (268), (Tomatis et al., 1977) (265), (Rustia, 1979) (232), (Nixon, 1979) (184). Estos autores utilizando diversos carcinógenos observaron que eran capaces de atravesar la placenta y provocar tumores en los descendientes.

En los hamsters, la administración intranasal de hidrocarburos carcinógenos, induce carcinomas de células escamosas en pulmón (Homburger, 1978) (113). La implantación local o ingestión de 2-acetilaminofluoreno produce carcinomas vesicales (Morris y cols. 1959) (172).

A veces la vía de aplicación es la responsable de que un compuesto sea carcinógeno o no, así, la cicasina es activa

cuando se administra por boca, pero no cuando se inyecta parenteralmente, debido a que este agente requiere una hidrólisis enzimática mediada por la flora (Lequeur, 1979) (133).

EDAD

Otro de los factores que van a modificar la carcinogénesis es el proceso de envejecimiento. A este respecto son interesantes los trabajos realizados por Deloitre en 1973 (57), Franks en 1974 (82), Reuber y Lee en 1968 (221), y Armitage y Doll en 1954 (13).

El cáncer "per se" se ha afirmado, es una enfermedad de la edad avanzada. Algunos estudios indican que el envejecimiento aumenta la susceptibilidad de la piel del ratón al Dimetilbenzantraceno, y que la inyección de 3-metilcolantreno produce una incidencia mayor de tumores en animales viejos que en animales destetados; sin embargo, la nitrosaminas y los colorantes azoicos resultan más efectivos para producir tumores hepáticos en animales más jóvenes. Pitot, 1982 (203), Toth, 1968 (266), Tomatis et al., 1973 (264), sostienen que en la inducción de tumores por agentes químicos, son más susceptibles los animales jóvenes, y esto probablemente sea porque presentan un mayor índice de proliferación celular. Además, según Brodie y Gillete en 1971 (35), el metabolismo enzimático de los carcinógenos químicos, estaría menos desarrollado o sería más inmaduro en los animales más jóvenes. Los fetos son muy sensibles a la acción de los carcinógenos siempre que estos hayan sido metabolizados

a su forma activa por la madre, y sean capaces de atravesar la barrera placentaria (Weisburger y Williams, 1975) (239).

Podemos resumir diciendo que la edad va a condicionar la carcinogénesis, aunque esta va a depender más directamente de otros factores como son la composición química de los carcinógenos.

DIETA Y HABITOS NUTRITIVOS

Mucho se ha investigado recientemente en este campo. Berenblum en 1974 (23), considera que la dieta puede actuar bajo dos aspectos diferentes sobre la carcinogénesis; carcinógenos asociados a específicos componentes en la dieta, o bien alterando el aporte calórico. Uno de los modificadores más notables sobre la carcinogénesis, es el efecto de la restricción calórica, que va a disminuir considerablemente la incidencia de tumores, tanto experimentales como espontáneos (Berenblum, 1974) (23), (Alcántara, 1976) (2). Los tumores cutáneos experimentales producidos por dibenzantraceno, disminuyen en un 50% cuando a los animales de experimentación se les somete a una restricción calórica (Ebbsen, 1974) (74).

En los estudios epidemiológicos sobre el cáncer humano, se demuestra que las personas con un exceso de peso del 25% o más, tienen un tercio mayor de incidencia de padecer cáncer que las personas normales (Adami et al., 1977) (1), (Mortiner Lipsett, 1979) (175).

También se demuestra una relación entre los tumores inducidos por carcinógenos químicos y la cantidad de proteínas de la dieta (Ross y Bras, 1973) (230). El metabolismo y la carcinogénesis del benzopireno están disminuidos en dietas proteicas deficientes (Paine y McLean, 1973) (199). Una dieta carente de proteínas reduce los tumores hepáticos producidos por la dimetilnitrosamina, debido a un decremento en la N-demetilación (Weirburger y Williams, 1975) (279). Sin embargo, un déficit protéico no va a disminuir la incidencia de tumores renales inducidos por este mismo compuesto. Por el contrario, un exceso de proteínas en la dieta, aumenta la incidencia de papilomas de vejiga (McLean and Magee, 1970) (153).

La dieta va a influir en la flora intestinal, lo cual puede ser un factor importante en el metabolismo de ciertos carcinógenos (Hill, 1974) (109), (Weisburger, 1973) (277), (Lagueur 1970) (133).

La primera relación que se establece entre un determinado componente de la dieta y la carcinogénesis química, fue con relación a la rivo flavina y la carcinogenicidad de los colorantes azoicos (Miller and Miller, 1948) (156). Morris et al. en 1963 (174), estudiaron la influencia de una dieta rica en piridoxina sobre la carcinogénesis de las ratas que ingerían 2-acetilaminofluoreno. Los efectos de la dieta sobre la carcinogénesis no sólo se limitan a que aparezcan mayor o menor número de tumores, sino que también van a influir en la organoespecificidad

de los carcinógenos. Así, en el trabajo de Dunning en 1950 (72) se reporta una mayor incidencia de tumores vesicales en ratas alimentadas con un suplemento de triptofano al aplicarles el carcinógeno 2-acetilaminofluoreno, si el triptofano se eliminaba de la dieta entonces se desarrollaban tumores en otros órganos. Poco después, estos mismos autores pusieron de manifiesto la influencia co-carcinogénica de triptofano.

Chan et al. en 1972 (46) establece una posible relación entre tumores epiteliales y un déficit de riboflavina.

En la carcinogénesis inducida por dietilnitrosamina aumenta el número de tumores hepáticos producidos cuando se administra una dieta rica en grasas y deficiente en colina (Rogers et al., 1974) (228), (Rogers, 1977) (229), (Poitier, 1975) (204). Hechos similares ocurren en la carcinogénesis por la aflatoxina B1 y el cáncer de colon producido por la dimetilhidracina (Mc Lean and Marshall, 1971) (154).

Es importante señalar la acción de la vitamina A en las neoplasias cutáneas y pulmonares (Prutkin, 1971) (216). Una dieta con altas concentraciones de esta vitamina, inhibe la carcinogénesis cutánea por dimetilbenzantraceno en los ratones (Bollag, 1972) (29).

También la vitamina A inhibe la formación de tumores vesicales inducidos por N-metilnitrosourea (Sporn et al. 1977) (248).

En resumen, podemos afirmar, que el efecto de la dieta debe interpretarse más como modificador e incluso promotor de la carcinogénesis.

SEXO Y STATUS HORMONAL

Los principales modificadores endógenos de la carcinogénesis en un organismo pluricelular, son las hormonas endógenas.

En muchas de las especies experimentadas, los machos son más susceptibles a la hepatocarcinogenicidad de algunas aminas aromáticas que las hembras; por el contrario, el ratón es mucho más sensible a la acción de diversos hidrocarburos y aminozotolueno. También los ratones hembras, son más sensibles a la dietilnitrosamina (Weisburger and Williams, 1975) (279).

Las bases de estas variaciones de la carcinogenicidad con respecto al sexo, no están actualmente claras, en algunos casos especiales, podría pensarse que las hormonas esteroideas compiten en el metabolismo de los carcinógenos (Weisburger and Williams, 1975) (279). Los esteroides inhiben el metabolismo del benzopireno (Neber et al., 1970) (180), aflatoxinas (Patterson and Roberts, 1972) (200) y 7-12-dimetilbenzantraceno (Booth et al. 1974) (33). Otra posible justificación de las diferencias de comportamiento de los sexos en la carcinogénesis, podría ser por la cantidad o actividad de las enzimas metabolizadoras (Conney y Burnus, 1972) (53).

Con respecto a las hormonas, estas pueden ser consideradas agentes inductores o inhibidores en el desarrollo de tipos específicos de cáncer. Este hecho fue primeramente apuntado por Beatson en 1896 (18), quien sugirió la existencia de una relación entre el cáncer de mama y el ovario.

Los primeros trabajos que resaltan la importancia del equilibrio endocrino en la carcinogénesis de los tejidos considerados no hormono-dependientes, se remontan a Bielschowky en 1961 (28), que estudiaron la susceptibilidad a carcinógenos hepáticos, bajo varios status hormonales. Estudiaron la inducción de tumores hepáticos en ratas macho tras la administración de 2-acetialiofluoreno a animales a los que se les había realizado tiroidectomía, adrenalectomía, o se les hacía dietéticas, observando que la inducción de hepatomas disminuía considerablemente con aumento en la aparición de adenomas y colangiomas.

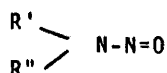
La carcinogénesis de la piel por determinados agentes, se estimula por la administración de estrógenos y es inhibida por la tiroxina (Berenblum en 1975) (23). La carcinogénesis mamaria por hidrocarburos se ve aumentada por la progesterona, y también por los estrógenos (Berenblum, 1975) (23).

La acción carcinogénica del stroncio esta favorecida por las hormonas esteroideas (Nilsson y Agueta, 1976) (183).

Berenblum en 1975 (23) considera en cuanto a la relación de hormonas y carcinogénesis que el proceso de carcinogénesis experimental química no es dependiente de la acción hormonal, con la excepción de aquellos órganos (mama, por ejemplo), en los que la deprivación hormonal induce una atrofia. En estos casos, la carcinogénesis ya iniciada está influenciada por el balance hormonal. El mecanismo de acción del disturbio hormonal no es conocido en muchos casos y probablemente difiere en cada uno.

QUIMICA GENERAL DE LOS COMPUESTOS N-NITROSOS

Todos los compuestos N-nitrosos responden a la siguiente fórmula general:



en la cual existe un radical alquilo, y el otro puede presentar gran variabilidad, pudiendo corresponder a grupos aromáticos, carboxílicos, amidas, etc.

Como el grupo nitroso ($\text{O}=\text{N}$) es el único común a todos estos compuestos, las propiedades físicas de los compuestos nitrosos variarían mucho de unos a otros.

Así, por ejemplo, la dimetilnitrosamina, es un líquido oleoso, miscible en agua en todas las proporciones, sin embargo, otros compuestos son sólidos o líquidos en condiciones normales, algunos escasamente solubles en agua pero sí lo son en disolventes orgánicos. Las propiedades más importantes de estos compuestos las podemos resumir en:

- Fotosensibilidad.- Los compuestos n-nitrosos son característicamente fotosensibles, y su grupo nitroso puede desdoblarse por exposición a la luz ultravioleta. Los compuestos N-alquilnitrosouretanos en solución alcohólica acuosa dan por acción de la luz compuestos cristalinos.

- Oxidación.- Demostrada "in vivo" por Preussman en 1964 (215). Esta oxidación supone la pérdida de un grupo metilo. En el caso de la dimetilnitrosamina se formaría monometilnitrosamina que es un compuesto muy inestable, transformándose rápida-

mente en un diazonio que es un compuesto alquilante. Los mecanismos de alquilación de los compuestos nitrosos en relación a su carcinogénesis han sido extensamente estudiados por Druckrey et al. en 1963 (61).

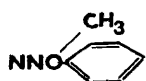
- Reducción.- El grupo nitroso puede ser reducido con formación de las correspondientes hidrazinas:



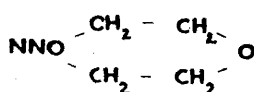
- Reacción con grupos sulfihidricos.- Demostrada en algunos compuestos. Así el N-metil-O-nitrosouretano reacciona con grupos sulfihidricos a pH neutro y temperatura ambiente.

- Reacción con ácidos y álcalis.- Los compuestos n-nitrosos según su comportamiento frente a los álcalis, se dividen en dos grupos: Nitrosaminas y Nitrosamidas.

Las nitrosaminas son derivados nitrosos secundarios de una amina. Son compuestos estables frente a los álcalis incluso a altas temperaturas(Druckrey et al. 1965) (64). Su acción principal la ejercen sobre el tejido hepático provocando una necrosis centrolobulillar hemorrágica, también condicionan afectación renal. Las nitrosaminas de acción carcinogénica más conocidas responden a la siguiente fórmula:



Metilfenilnitrosamina

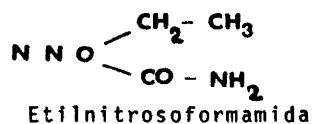


Eterdietiliconitrosamina

Las nitrosamidas por el contrario, son sensibles a los alcalis bajo cuya acción se desdobla a diazoalcano. Las nitrosamidas son derivados en los que uno de los radicales es un grupo alquilo y el otro es un grupo acil. Como ya se ha dicho, son muy sensibles a los alcalis, resultando poco tóxicas a nivel hepático, sin embargo, poseen una notable irritación y toxicidad local. Druckrey en 1975 (71) agrupa las nitrosamidas en cinco grupos: Carboxilamidas, Ureas, Uretano, Triuretanos y N-nitrosoguanidinas.

Las nitrosamidas tienen importancia en la química como punto de partida para la obtención de diazometano.

Algunas nitrosamidas más importantes son:



CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA N-NITROSOMETIL-UREA (M.N.U.)

La nitrosometilurea, sustancia utilizada en el presente trabajo, es un compuesto N-nitroso caracterizado por Druckrey en 1967 (67). Es un derivado de la urea, que a su vez pertenece a una amplia familia de compuestos denominados amidas.

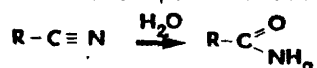
Las amidas (R-CO-NH_2) tienen puntos de ebullición anormalmente elevados y se pueden considerar como derivados del ácido carboxílico que reacciona con el amoníaco.



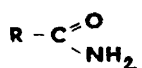
También pueden obtenerse por deshidratación de las sales amónicas.



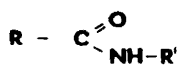
O también por hidrólisis parcial de los nitritos.



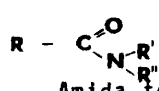
Las amidas se dividen en subclases según el número de sustituyentes del nitrógeno



Amida primaria



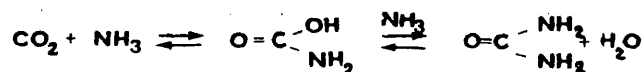
Amida secundaria



Amida terciaria

La urea es la diamida del ácido carbónico ($CO(NH_2)_2$); en los seres vivos es el producto final de la degradación de las proteínas. En la industria es un producto químico de intensa fabricación utilizado fundamentalmente como abono, para la obtención de plásticos termoestables y para la fabricación de ácido barbitúrico.

Su fabricación se obtiene a partir de dióxido de carbono y amoníaco a temperatura y presión elevadas.

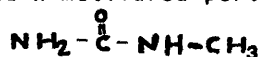


La urea es un sólido cristalino que funde a $132.7^\circ C$, muy soluble en agua y que se hidroliza fácilmente por medio de la enzima ureasa dando CO_2 y NH_3 .

La urea puede dar lugar a un gran número de derivados.

Los N-alquilderivados y los O-alquilderivados, según tengan el grupo Alquil unido al átomo de nitrógeno o al de oxígeno.

La N-metilurea pertenece a este grupo de compuestos.



A su vez, las amidas, y concretamente la urea, pueden reaccionar con ácido nítrico NO_3H , dando nitrato de urea que por calentamiento da derivados nitrosos. Los nitrosos derivados de las amidas monosustituídas encuentran gran utilidad en la obtención de los diazoalcanos.

En este grupo de derivados se encuentra la N-nitrosometilurea, compuesto N-nitroso empleado en el presente trabajo.

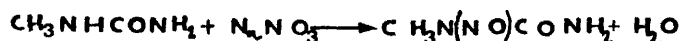
OBTENCION DE LA N-METILNITROSUREA

Un método sencillo es el puesto de manifiesto por F. Arnoldt en 1940 (15) partiendo de hidrocloreto de metilamina. Dicho proceder se realiza de la siguiente manera:

En un matraz de fondo redondo de un litro de capacidad, se prepara una solución de 85 gr. de hidrocloreto de metilamina y 255 gr. de urea en 380 c.c. de agua, y se hierve suavemente durante 15 minutos. La disolución se enfría a temperatura ambiente y se disuelve en ella 95 gr. de NO_2Na del 95%, enfriándose lentamente con agitación. A una mezcla de 510 gr. de hielo picado y 85 cc. de ácido sulfúrico concentrado en un vaso, se añade la disolución de metilurea y nitrito sódico, poco a poco, y con agitación. La temperatura no debe subir de 0°C . La N-O-nitrosometilurea sube a la superficie en forma de precipitado cristalino espumoso. Se filtra a vacío, se lava con agua a 0°C . y se deseca

bien a vacío. Se obtienen así unos 85 gr. de un sólido blanco que después de bien desecado ha de guardarse en nevera y en frasco de color topacio.

En resumen las reacciones químicas que se producen son las siguientes: $\text{CH}_3\text{-NH}_2 + \text{NH}_2\text{CONH}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{NHCONH}_2 + \text{NH}_3$



Existen otros procedimientos de síntesis de la N-nitrosometilurea: Arnold y Amande en 1930 (14), Owen y cols. en 1938 (198). Todos estos procedimientos van seguidos de nitrosación con ácido nitroso o nitrito sódico.

La N-nitrosometilurea, es un compuesto cristalino que desde el punto de vista industrial es importante para la síntesis del diazometano.



Los efectos de la intoxicación aguda por M.N.U. fueron estudiados por Druckrey en 1967 (66) en la rata, estableciendo la DL 50 en 180 mg/kg. El cuadro se caracteriza por graves dosis de la M.O, tejido linfoide, también se producen úlceras y hemorragias en estómago, intestino y páncreas. Estos síntomas aparecen tanto si se administra por vía oral como endovenosa.

CARCINOGENESIS DE LOS COMPUESTOS N-NITROSOS

El descubrimiento de la carcinogenicidad de los compuestos N-nitrosos, fue puramente accidental. La intoxicación con dimetilnitrosamina fue estudiada por Barnes y Maggee en 1954 (16), después de que se habían descrito casos de intoxicación

en trabajadores de laboratorios industriales en contacto con esta sustancia. Sin embargo, la primera reseña parece corresponder a Freud en 1937 (83) quien describió los hallazgos de autopsia en dos químicos intoxicados accidentalmente por dimetilnitrosamina. De los estudios de Barnes y Magee en 1954 (16), se dedujo que la dimetilnitrosamina es un potente hepatotóxico. Estos mismos autores, Magee y Barnes en 1956 (16) descubrieron la acción carcinogénica de las nitrosaminas al provocar hepatomas en animales de experimentación, en cuya dieta se había añadido 50 ppm de dimetilnitrosamina. Los tumores hepáticos malignos se desarrollaban en un tiempo inferior a un año. Se descubrió que estas sustancias son carcinogénicas prácticamente para todo el reino animal, constituyendo un medio idóneo para el estudio de la problemática de la carcinogénesis química.

Desde esta observación primaria, se han publicado numerosísimos trabajos sobre la acción tóxica y carcinogénica, no sólo de la dimetilnitrosamina, sino de muchísimos otros derivados N-nitrosos (más de 65). La actividad carcinogénica de estos compuestos ha sido revisada fundamentalmente por Druckrey en 1967 (87), Magee y Swann en 1969 (148), Montesano en 1970 (168), Schoental en 1973 (240), Magee et al. en 1976 (147).

Antes de pasar a realizar esta revisión, creemos conveniente hacer un breve repaso sobre la importancia biológica y la presencia de los compuestos N-nitrosos en el medio ambiente.

Nitrosaminas existen en el humo del tabaco, en las bebidas alcohólicas, en los cereales, en determinadas circunstancias,

en los alimentos en conserva en forma de nitritos, y en una larga lista de compuestos con los que mantenemos contacto diario (Stewart, 1978) (250). Bien es cierto, que no todas las nitrosaminas son carcinógenas, pero la importancia de la presencia de compuestos nitrosos en el entorno del hombre radica en la posibilidad de que se puedan formar nitrosaminas "in vivo" y producir tumores en sujetos que aparentemente no están en contacto con ellas. (Lijinsky y Epstein en 1970 (138), Miller en 1975 (163). Saucher et al., en 1981 () y Sander y Burkle en 1969 (235), demostraron que las aminas secundarias pueden reaccionar con nitritos a pH ácido y formar nitrosaminas. La importancia de este hecho radica para el hombre en que los nitritos aparecen en cantidades considerables en el medio ambiente, siendo este también muy rico en aminas secundarias (Borzsavay, 1977) (32).

Las nitrosaminas se forman con facilidad a partir de aminas secundarias o terciarias, mediante combinación con los nitritos como indicamos en el capítulo anterior. Esta reacción puede ocurrir en diversas condiciones de pH y temperatura. Según esto, se podrían formar nitrosaminas espontáneamente, por ejemplo en el suelo durante el almacenamiento de alimentos, o bien al preparar estos, como freír tocino, incluso la transformación podría influir de forma directa o indirecta catalizando la unión entre la amina y el nitrito. De esta forma se considera que el estómago aclorhídrico, o bien la vejiga infectada, pueden prestarse mucho para la síntesis de las nitrosaminas (Wynder-Rauscher, 1977) (287).

Aunque las aminos existen en muchos alimentos, también se ingieren de forma pura como medicamentos, tales como quina-
crina, clorpromacina, tolazamina.

Los nitritos y nitratos son componentes naturales del agua y de los alimentos, y también se utilizan para su preservación. También es importante un hecho señalado por diversos autores, referente al bloqueo ejercido por el ácido ascórbico en la formación de las nitrosaminas (Shaw-Kong, 1979) (242), de tal forma, que podríamos decir que la costumbre de ingerir zumos de naranja en el desayuno nos preservaría de la posible acción carcinogénica de las nitrosaminas formadas in vivo.

La relación epidemiológica más fuerte entre los alimentos que contienen nitrosaminas y cáncer, ocurre en los japoneses; se piensa que el pescado salado, es sin duda un factor de riesgo para el cáncer de estómago, y al mismo tiempo se sabe que es una gran fuente de nitrosaminas.

CARCINOGENESIS DE LOS COMPUESTOS N-NITROSOS

Todos estos compuestos presentan una constancia en sus efectos carcinogénicos sistémicos; todas las especies estudiadas son sensibles a ellos en mayor o menor grado. Dentro de la misma especie animal, sus efectos carcinogénicos están en relación con la dosis y el modo de administración. También es característico de estas sustancias, que presenten un organotropismo determinado por la naturaleza química del compuesto principalmente. Con

respecto a su modo de actuación, los compuestos que actúan como agentes alquilantes (Magee y Farber, 1962) (146), (Maekawa y Odashima, 1975) (141), (Loveles, 1969) (140), (Kruger et al., 1970) (131), (Hoch-Ligeti, 1964) (112), (Hill et al., 1975) (107), (Graw, 1973) (91), (Goth y Ragewsky, 1972) (89), (Druckrey et al., 1975) (71), (Druckrey et al., 1963) (61), (Margison et al. 1979) (150), (Wheeler, 1978) (275), (Warzok et al., 1978) (272), (Schoental y Rive, 1965) (239), (Naha, 1975) (178), (Montgomery et al., 1967) (171), (Montesano, 1980) (170).

A continuación revisaremos de forma resumida los efectos carcinogénicos de los compuestos N-nitroso en los diferentes órganos.

En el tracto respiratorio. Son interesantes los estudios realizados por Montesano en 1970 (168) administrando estos carcinógenos solos o junto a otros carcinógenos. Sostiene este autor que el tracto respiratorio del hamster ofrece una susceptibilidad especial a la acción carcinogénica de algunas nitrosaminas. A este respecto también se refieren algunos trabajos realizados por Mohr y cols. en 1974 (166), los cuales indujeron tumores en el tracto respiratorio de estos animales tras inyección subcutánea de dietilnitrosamina. La simple variación del grupo etil por el metil no indujo tumores a nivel del tracto respiratorio, empleando la misma especie animal (Dotenwill, 1970) (59).

Hans y cols. en 1973 (95) con el empleo de N-nitrosomorfina subcutáneamente, indujeron en el hamster de un 65% a un

100% de tumores en la traquea. Montesano en 1970 (168) hace énfasis en estudios comparativos realizados en la misma especie animal con diferentes nitrosaminas.

Montesano et al. en 1974 (169) empleando dietilnitrosamina, también indujeron tumores en el tracto respiratorio alto. Estos hallazgos se repitieron con otros compuestos N-nitrosos. Pour et al. en 1974 (208) con 2-hydroxypropyl-n-propyl nitrosamina. Pour et al. en 1973 y 1974 (207) con dipropilnitrosamina. Pour et al. en 1974 (208) con metilpropilnitrosamina. Con todos estos derivados, se observó una alta incidencia de carcinomas en las vías respiratorias altas.

Otros muchos compuestos N-nitrosos administrados por vía subcutánea a dosis variables y en períodos de tiempo también variables son capaces de producir con especial predilección cáncer en las vías respiratorias altas. A este respecto se refieren los trabajos de Althoff et al. en 1975 (8) con Di-n-propyl nitrosamina. Althoff et al. en 1973 (7) con dipropilnitrosamina. Althoff et al. en 1973 (6) con nitrohexametilamina, y también estos mismos autores en 1971 (5) con dietilnitrosamina. Todos estos compuestos mostraron un organotropismo en la producción de cáncer de las vías respiratorias altas.

Harris et al en 1973 (98) empleando nitrosometilurea a dosis de 0.5 mgr/ semanalmente por vía intraperitoneal, indujeron carcinomas escamosos del epitelio traqueal.

Harns et al. en 1973 (95) comparan los efectos producidos por la nitrosometilurea con los observados en los déficit de

vitamina A sobre el epitelio traqueal, ambos producen cambios displasicos, pero los cambios producidos por la nitrosometilurea son diferentes a los producidos por el déficit de vitamina A.

Hilfrich et al. en 1973 (106) realizaron un estudio describiendo los hallazgos citológicos e histológicos de los tumores pulmonares cuando se administra nitrosometilurea intratraquealmente.

Stemback et al. en 1973 (249) estudió los efectos de la dimetilnitrosamina inyectada subcutáneamente a ratas a las que simultáneamente se las realizaba instilaciones intratraqueales de ácido fénico. La dimetilnitrosamina sola no produjo tumores en el aparato respiratorio, y si por el contrario una alta incidencia de tumores vasculares hepáticos.

Yarita Tsutom en 1978 (291) indujo tumores en la traquea del hamster mediante una exposición repetida a NMU con un catéter intratraqueal.

Orhan y cols. en 1979 (196) compararon la acción carcinogénica de diferentes compuestos N-nitrosos administrados en el agua de bebida de forma crónica a ratas Wistar. La etilnitrosoamina, mostró selectividad por las cavidades nasales con la aparición de un 36% de tumores en esta localización.

Has y cols. en 1973 (95) en un extenso trabajo con 520 hamsters inyectados subcutáneamente con diferentes compuestos N-nitrosos, observaron un organotropismo selectivo de cada uno de ellos, de tal forma que la N-nitrosopiridina y N-nitrosomorfolina producían de un 65% a un 100% de tumores de traquea.

Sobre el tracto gastrointestinal.- Son importantes los trabajos realizados por Hiraki en 1971 (110), Hiraki en 1974 (111), quien con el empleo de NMU por inyección subcutánea, encontró un alto porcentaje de tumores de estómago en los hamsters. Anteriormente, Herrold en 1969 (104) empleando este mismo compuesto, no encontró ni un sólo carcinoma de estómago, sin embargo indujo tumores de intestino delgado y grueso.

Takahaski y cols. en 1975 (257) con el empleo de nitrosoguanidina indujeron adenocarcinomas de estómago en ratas.

Con respecto a la acción de estos compuestos sobre el hígado, ya es historia la hepatocarcinogenicidad de la dimetilnitrosamina, demostrada por Barnes y Magee en 1956 (16). Argus y Hoch-Ligetti en 1961 (12) realizaron un estudio comparativo de la acción de diversos compuestos N-nitrosos en ratas, demostrando una vez más que la dimetilnitrosamina indujo tumores hepáticos en todos los animales, mientras que con el empleo de difenilnitrosamina y dimetilhidracina no se encontró acción carcinogénica.

Takayama et al. en 1975 (258) también indujeron tumores hepáticos empleando dietilnitrosamina en el agua de bebida de ratas durante un periodo de tiempo variable. Este autor realizó un estudio sobre los hallazgos citológicos e histológicos en los tumores hepáticos inducidos.

La acción carcinogénica de estos compuestos se extiende hasta la vesícula biliar, en la que Kowaleswski y Todd en 1971

(128) indujeron carcinomas con la administración de dimetilnitrosamina, y al mismo tiempo, implantación de partículas de colesterol en la vesícula.

Hiraki en 1971 (110) con dimetilnitrosourea inyectada subcutáneamente a dosis de 40 mg/kg. durante 24 semanas a hamsters, indujo carcinomas de estomago en un 68% de los animales.

Herrold en 1969 (104) administró por vía endovenosa 2'5 mg. de NMU mensualmente durante 3-4 meses, y también 1 mg/semana intraperitonealmente, durante 4-5 meses, realizando un magnífico estudio sobre las características histológicas de los tumores intestinales producidos por NMU.

Las nitrosaminas, específicamente nitro^Sal¹propilamina, inducen hepatomas cuando se administran subcutáneamente. La metil-nitrosopropilamina produce también carcinomas escamosos de esófago (Althoff et al. 1973) (7).

Trabajos más recientes sobre derivados nitrosos muestran inducción de carcinomas en muchos sitios, incluyendo páncreas, hígado, vasos. etc. (Pour et al., 1974) (209), (Pour et al. 1975) (211), (Pour et al., 1976) (213), (Pour et al., 1976) (214), (Pour et al., 1976) (207), (Pour et al, 1979) (212).

Los compuestos N-nitrosos también producen tumores en el sistema urinario. Butler en 1975 (42) indujo tumores del parenquima renal en ratas tras la administración de 60 mg/kg. de dimetilnitrosamina. Estos compuestos también son potentes carcinógenos en la vejiga urinaria (Okada et al., 1975) (195).

Odashima et al., en 1975 (193) indujeron leucemia en ratas con diversos compuestos nitrosos administrados en el agua de bebida, siendo la etilnitrosourea la que producía mayor cantidad de leucemias.

También ha sido extensamente demostrada la acción carcinogénica local de estas sustancias. Los compuestos N-nitrosos son capaces de producir rhabdomyosarcoma después de la aplicación tóptica de los mismos (Woods y Smith, 1970) (286).

A pesar de que estos compuestos son carcinógenos sistémicos, es característico que presenten una organoespecificidad que va a depender de la especie animal y de las características de la molécula del carcinógeno principalmente.

La dimetilnitrosourea por inyección intravenosa, produce tumores nerviosos en ratas y timomas en ratones (Koestner y cols. 1972) (127); sin embargo, en los hamsters esta misma sustancia produjo tumores de mama en un 79% y tumores de cuello uterino en un 86% de los animales (Gullino et al., 1975) (92), (Bots y Willighagen, 1974) (33).

Haas y cols. en 1973 (95) inyectaron subcutáneamente diversos compuestos N-nitrosos, observando un organotropismo selectivo de cada uno de ellos, de tal forma, que la nitrosopiridina produce un 65% a un 100% de tumores de traquea, mientras que la NMU indujo más de un 65% de sarcomas, localizados en el sitio de la inyección.

Orhan y cols. en 1979 (197) estudiaron la acción carcinogénica de 6 diferentes compuestos nitrosos en ratas Wistar, que fueron administrados de forma crónica en el agua de bebida. La etilnitrosourea produjo tumores en el sistema retículo endotelial en un 50%, también produjo tumores de mama e intestino delgado. la 2-hidroxietilnitrosourea indujo un 38% de tumores óseos y un 28% de tumores en el sistema retículo endotelial. La etilnitrosocianamina produjo un 36% de tumores en cavidades nasales. El resto de los compuestos, carboximetilnitrosourea, metilnitrosobenzamida, nitroso 5-6 dihidrouracil, y nitrosohidantoína, indujeron principalmente tumores gástricos en un 47% de los casos atribuidos a la acción local del carcinógeno.

ACCION CARCINOGENICA DE LOS COMPUESTOS N-NITROSOS EN EL SISTEMA NERVIOSO

Los primeros compuestos N-nitrosos capaces de producir tumores en el sistema nervioso, fueron los descritos por Druckrey et al. en 1963 (61). Posteriormente, este mismo autor, Druckrey et al. 1965, 1967, 1972, 1975 (64,66,68,71) ampliaron considerablemente el conocimiento de los compuestos nitrosos como carcinógenos, estudiando los diferentes efectos organotrópicos de cada uno de ellos. Observaron que los compuestos nitrosos del grupo de las ureas, como la metilnitrosourea, empleada en el presente trabajo, y la etilnitrosourea, muestran un especial organotropismo por el sistema nervioso.

La ENU y MNU son acil-alquilnitrosamidas, y en contraste con las nitrosaminas no requieren de activación enzimática para ejercer su acción carcinogénica. Al igual que el resto de los compuestos nitrosos actúan como carcinógenos sistémicos, aunque los efectos de la MNU son auténticamente organotrópicos, como demostró Druckrey en 1967 (67) al comparar los efectos de la MNU con los del metilnitrosouretano. Ambas sustancias dan diazometano como forma activa, y aplicadas por vía oral producen carcinomas de estómago, sin embargo, aplicadas intravenosamente, la MNU produce selectivamente tumores cerebrales, a diferencia del metilnitrosouretano que produce carcinomas pulmonares. Druckrey et al. 1967 (68) atribuye este hecho a la totalidad de la molécula de acil-nitrosamida, descartando la hidrólisis como mecanismo de acción. Para el efecto neurotrófico es esencial el grupo urea como molécula transportadora. El resto del mecanismo es la producción de diazometano que alquila el DNA en la guanina.

Los efectos de estas sustancias también están relacionados con la dosis, modo de administración, tiempo de administración y edad de los animales.

La organoespecificidad de los compuestos nitrosos del grupo de las ureas, ha sido puesta de manifiesto en numerosos trabajos experimentales.

Janisch y Schreiber en 1967 (49) administraron por vía intravenosa NMU a dosis de 10 mg/kg. cada 15 días, hasta un total de 152 a 293 días, provocando una alta incidencia de tumores neutrógenos.

Stoobandt y Bucher en 1968 (253) administraron por vía oral NMU de forma crónica produciendo 29 tumores nerviosos en un total de 99 ratas Wistar.

Koestner y cols. en 1972 (127) emplearon diversas vías de administración de la NMU a ratas Wistar adultas a dosis de 5 mg/kg. hasta un total de 18 mg/kg. Observaron que al emplear la vía intravenosa se producían un 97% de tumores nerviosos, estas cifras descendían a un 52% al emplear la vía oral; si la administración se realiza por vía intraperitoneal, aparecían un 36% , mientras que por vía subcutánea era de un 12%.

Druckrey et al. en 1965-1967 (64,66) encontraron tumores nerviosos en el 90% de las ratas adultas a las que habían administrado NMU por vía intravenosa.

Martínez y cols. en 1974 (186) empleando la vía intraperitoneal y a dosis de NMU de 10 mg/kg. semanalmente, hasta un total de 24 semanas, obtuvieron un 33% de tumores neuroectodérmicos.

El organotropismo por el sistema nervioso, se ha demostrado en otras especies. Koestner et al. en 1972 (127) admiten que la localización de los tumores producidos por los compuestos del grupo de la urea, NMU, ENU, está en relación con la vía de administración del carcinógeno.

La administración intravenosa a dosis bajas de NMU, produce casi exclusivamente, tumores del sistema nervioso (Druckrey et al. 1967) (66). Cuando se administra subcutáneamente, oral o intraperitoneal, produce tumores en la vecindad del sitio de

implantación, lo que demuestra que la NMU tiene también una acción local. Su administración a la rata en el agua de bebida, produce tumores hepáticos (Druckrey et al., 1967) (66). También han sido descritos adenocarcinomas de intestino delgado, colon y recto, producidos en ratas después de una dosis única intravenosa de NMU (Druckrey et al. 1964) (63), y también después de una dosis única oral. Druckrey et al. en 1964 (62) tras una dosis simple intravenosa de NMU observó 11 tipos diferentes de tumores en un grupo de 16 ratas.

Bots y Willighagen en 1974 (33) indujeron tumores de mama en ratas tras inyección intravenosa de NMU a dosis de 25 mg/kg. En las ratas hembras el porcentaje de tumores aparecidos fue muy alto, en 23 de los 35 animales, mientras que sólo apareció en un macho de los 20 a los que se administró el carcinógeno. Gullino et al. en 1975 (92) indujeron carcinomas mamarios en ratas hembras, tras inyección inyección intravenosa de NMU estudiando la acción de la castración sobre la carcinogénesis de estos compuestos, observando que cuando ésta se realizaba antes de la administración del carcinógeno, de alguna forma, la castración prevenía la carcinogénesis, si su administración era posterior reducía el número de tumores por rata, pero no la incidencia.

Thomas et al., en 1967 (263) utilizaron la NMU por vía oral a dosis de 5 mg/kg. obteniendo un alto porcentaje de tumores abdominales del tipo de neurinomas malignos.

La literatura sobre la acción de la NMU por vía trasplacentaria es menos extensa que con la ENU. La administración de NMU

por vía intravenosa a dosis de 20 mg/kg. en la rata en el día 22 aproximadamente de la gestación, también produce tumores nerviosos en la descendencia (Wechsler, 1972) (274).

La NMU es también un potente teratógeno que produce malformaciones en diferentes órganos y sistemas con gran mortalidad fetal, pero no especialmente en el sistema nervioso cuando se administra a una dosis única intravenosa a ratas entre los días 13 y 14 de la gestación (Von Kreybrig, 1968) (130), (Eisembrand et al., 1975) (76), (Druckrey, 1973) (61).

Las diferentes especies animales van a mostrar diferente susceptibilidad. La administración de NMU en el mono, no reveló producción de tumores nerviosos después de un periodo de observación de 4 años (Von Kreibrig, 1968) (130), (Koyama y cols., 1970) (129).

Los derivados de la urea, tanto la ENU como la MNU pueden producir tumores en el lugar de aplicación, así como en órganos alejados, después de su reabsorción (Kleihmes et al., 1970) (124). Vasillieva y Milieuskaya en 1972 (267) utilizaron NMU topicamente en cavidad bucal e indujeron un 54% de rabdomioblastomas en el sitio de aplicación y un 44% de tumores gástricos; este estudio fue realizado en hamsters.

La NMU por aplicaciones repetidas en la piel del ratón es un potente carcinógeno local. Graffi y Hoffman en 1967 (90) aplicaron NMU en solución de acetano en la piel del ratón, resultando

ser tan efectivo como los hidrocarburos policíclicos en producir cáncer.

La acción carcinogénica sistémica y el organotropismo de la NMU es puesto de manifiesto cuando se administra intravenosamente NMU marcada, observándose al poco tiempo de inyectada que se encuentra en muchos casos, incluido el cerebro, de forma uniforme (Kleihnes y Patzchke, 1971) (125), (Goth y Rajewsky, 1972) (89).

Recientemente Schmall y Habs en 1980 (238) defienden que el organotropismo de estos compuestos, no es sólo de su estructura química, sino también del factor dosis-tiempo. La vía de aplicación puede ser importante sobre el organotropismo de las nitrosamidas, sin embargo, juega un papel menos importante en el organotropismo de las nitrosaminas. A este respecto Schmahl realizó un interesante trabajo en el que aplicó dietilnitrosamina a una dosis única del 50% de la DL 50, y encontró predominio de carcinomas renales después de un período de latencia de 18-24 meses. Cuando la dosis del carcinógeno descendía al 2% de la DL 50 y su aplicación se realizaba diariamente en el agua de bebida, las ratas desarrollaban tumores de hígado. Si la dosis se reducía a un 0.5% de la DL 50 y se aplicaba crónicamente, además de carcinomas hepáticos se producían de esófago.

62

M A T E R I A L Y M E T O D O S

En el presente trabajo se han utilizado 179 ratas Wistar de las cuales 90 eran machos y 89 hembras. La elección de éste animal fue debida, en primer lugar a nuestra experiencia con el mismo en estudios previos sobre carcinogénesis química, así como a la facilidad de adquisición, economía, manejabilidad, siendo además este animal extensamente utilizado por grupos de investigadores en el campo de la oncogénesis experimental química (Stemback et al. 1973; Bulay Orhan y cols.; 1979, Takahasy y cols., 1975; Argus y Hoch-Ligetti, 1961; Takayama, 1975; Butter, 1975; Stoobandt y Bucher, 1968; Koestner y cols., 1972, etc.).

Los 179 animales utilizados en el experimento se clasificaron en dos series: Serie A, animales a los que se inyectó el carcinógeno, y Serie B, animales que fueron utilizados como control.

El carcinógeno administrado es la N-Metil-Nitrosourea, cuya preparación se realizaba semanalmente para prevenir las posibles transformaciones químicas que pudieran ocurrir en la molécula de N-Metil-Nitrosourea dependientes de la exposición al medio ambiente. La preparación del carcinógeno se hizo según fórmula del Profesor Lora Tamayo, realizada según el proceder siguiente:

Poner en un matraz 100 gr. de clorhidrato de metilamina (Schuchardt), 300 gr. de urea y 400 c.c. de agua destilada.

Colocar un poco de piedra pomez y ponerlo en ebullición no tumultuosa, 3 horas, colocando encima del matraz un condensador de reflujo. Enfriar a temperatura ambiente y disolver 110 gr. de nitrito sódico cristalizado, cuando este disuelto enfriar a 0° con hielo y sal.

En un vaso de precipitados poner 600 gr. de agua destilada congelada y echar encima lentamente 100 c.c. de SO_4H_3 concentrado rodeando el vaso de hielo y sal. A continuación echar la solución anterior lentamente y recomendando (igual que se echa el aceite en la mahonesa). La temperatura no debe subir de 0°. Se forma sobre la superficie una espuma blanda de MNU. Filtrar a la trompa por un Buchner (poner sobre el Buchner un papel de filtro mojado del mismo diámetro); echar por el embudo 200 c.c. de agua destilada a 0 - 1° en varias veces para lavar la MNU. Ponerlo a desecar bajo pentóxido. Se obtienen 100 - 110 gr. de MNU que tendrá color blanquecino. Conservarlo a 0° y sin luz.

Los animales proceden del estabulario de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina (Prof. Bullón). Todos los animales tenían la misma edad y estuvieron viviendo en condiciones ambientales idénticas.

El estabulario de nuestro Departamento, está situado en lugar poco ruidoso y dotado de sistema de aire acondicionado,

mediante el cual se mantiene a una temperatura constante de 20°C. La alimentación y bebida fue idéntica para todos los animales. El inicio del experimento se efectuó al cumplirse la octava semana de vida de los animales.

SERIE A

Constituida por 83 ratas de las cuales 44 eran machos y 39 hembras. Todos estos animales fueron pesados a partir de la octava semana de vida, momento en el que se inició la administración del carcinógeno N-Metil-Nitrosourea. Este fue introducido por inyección intraperitoneal cada siete días durante 24 semanas consecutivas; la dosis fue de 10 mg/kg. de peso por semana. El disolvente utilizado para el carcinógeno fue agua destilada en la proporción de 1 c.c. por 1 mgr. de M.N.U.

Estos animales fueron divididos en dos grupos A-I y A-II correspondientes a machos y hembras respectivamente.

Con el fin de estudiar la afectación individual del carcinógeno en cada animal se agruparon estos en jaulas de cinco animales cada una. Cada rata quedaba identificada mediante la amputación de la última falange de una pata trasera, enumerándose de la siguiente manera:



El peso inicial de los animales al comenzar la administración del carcinógeno, es decir, a las ocho semanas de vida, oscilaba entre 160 y 250 gr. Estos animales se mantuvieron en nuestro animalario hasta su muerte espontánea. El animal que más sobrevivió alcanzó la edad de 15 meses y 5 días.

De los animales referidos en esta serie, 3 animales, 2 machos y una hembra, murieron antes de la semana 24 de la inyección del carcinógeno. Es decir, no recibieron todas las dosis. En las autopsias realizadas a estas ratas no se observó ningún crecimiento tumoral visible al estudio macroscópico. Ocho animales, 3 machos y 5 hembras, se encontraron parcialmente devorados por los animales vivos con los que compartían la jaula. En sus restos no se identificó crecimiento tumoral macroscópico. Estos 11 animales, no han sido considerados válidos, por lo que el número de ratas de esta serie se redujo a 72, de los cuales 39 eran machos y 33 hembras.

SERIE B

Esta serie fue utilizada como control, y estaba constituida por 96 ratas Wistar, de las cuales 46 eran machos y 50 hembras. Al igual que la serie anterior fueron divididas en dos grupos 0-I y 0-II correspondientes a machos y hembras respectivamente.

El peso inicial de las ratas al comenzar el experimento, es decir a las ocho semanas de vida, estaba comprendido entre 190 y 210 gr. Estos animales fueron divididos en grupos de 5, en jaulas separadas, siendo manipuladas en el laboratorio como los de la serie A, exceptuandose la administración del carcinógeno que en este caso no se administró.

Las ratas de esta serie fueron mantenidas en las mismas condiciones alimenticias y ambientales que la serie anterior. De forma análoga a la serie A, dispusimos esperar a la muerte espontánea de los animales, si bien como ya dijimos, el animal de la serie A que vivió más tiempo alcanzó la edad de 15 meses y 5 días, por lo que por razones de necesidades del laboratorio decidimos el sacrificio de los animales de la serie B, control, a los 20 meses de edad.

Después de la muerte se realizó la autopsia de las mismas, en primer lugar de las cavidades torácica y abdominal, mediante una incisión perpendicular al eje mayor del cuerpo, seguido de evisceración en bloque de todos los órganos desde la laringe hasta el recto. En los casos en que existía tumor, se determinaba la localización exacta del mismo, o los mismos, y sus relaciones topográficas, anotando sus características macroscópicas referentes a: medida, consistencia, color, peso, delimitación, etc. Posteriormente se procedía a la apertura del Sistema Nervioso Central y médula espinal, anotando los hallazgos obtenidos de forma similar.

Los hallazgos macroscópicos obtenidos de las autopsias eran anotados en el protocolo de autopsia, realizado específicamente para tal fin (Fig. A), en el que además se incluyó el peso inicial y final, sexo y tiempo de supervivencia al experimento, después de la última dosis de carcinógeno.

Una vez determinadas las características macroscópicas del tumor o los tumores, se procedía al tallado de los mismos realizado de la siguiente manera: seleccionando material de diversas partes que se introdujeron para su fijación en formol al 10%, o bien en alcohol de 96°.

El resto del animal se introdujo en botes con formol al 10% para en caso necesario ser revisado de nuevo.

Las muestras procedentes tanto del formol al 10% como del alcohol, se incluyeron en parafina previa deshidratación alcohólica, siguiendo el método histológico convencional de los bloques de parafina. Se hicieron cortes de 5 micras en un microtomo tipo Minot, y previa desparafinación en xilol e hidratación en alcohololes de concentración descendente, fueron teñidos con técnicas de Hematoxilina-Eosina, P.A.S., Reticulina de Wilder, Tricrómico de Masson y Hematoxilina Fosfotungstica, y otras muestras fueron cortadas con el microtomo de congelación a unas 8 micras aproximadamente, y teñidas con técnicas para el estudio de lípidos con Sudan III y Oil Red.

Las muestras para microscopía electrónica se fijaron en glutaraldehído al 6% en buffer fosfato (Sorensen) a pH 7'4, 440 mOsM/l durante 90 minutos. Después de lavadas las piezas en buffer, fueron post-fijadas 90 minutos a 4°C en tetróxido de ósmio al 2%, en el mismo vehículo. A continuación, y tras un breve lavado en buffer acetato de veronal (Michaelis) a pH 7'4, los tejidos se estabilizaron en acetato de uranilo procediendo después a su deshidratación con acetonas descendentes y su posterior inclusión en araldita.

El primer paso de la inclusión consiste en someter a los bloques a la acción del óxido de propileno con Araldita I a partes iguales, en estufa de 50° dejando los bloques durante 24 horas. Posteriormente se pasa el material a Araldita II dos horas en estufa de 50°C y por último un segundo baño de Araldita II ya en la cápsula de inclusión, dejándose en la estufa de 70°C dos días, antes de proceder a ser cortados con el ultramicrotomo.

De estos bloques se realizaron cortes semifinos de control que fueron reñidos con la técnica de azul de toluidina y sirvieron para seleccionar posteriormente cortes ultrafinos que se realizaron con un ultramicrotomo LKB-III equipado con cuchillas de vidrio, controlando la correcta realización de los mismos por el color de interferencia blanco amarillo. Los

cortes recogidos en rejillas sin filmar fueron contrastados por uranio y plomo (método de Reynolds) y examinados en un microscopio electrónico Hitachi HU-12-A operando a 75 y 100 Kv de potencial de aceleración.

El estudio con microscopía electrónica se realizó sólo en aquellos casos en los que el estudio con microscopía convencional planteaba problemas de diagnóstico diferencial entre diversos tipos de tumor.

Hay que considerar que el material tomado para microscopía electrónica procedía de animales que en algunos casos llevaban varias horas muertos, por lo que la calidad de las muestras se ve artefactuada por los fenómenos de autólisis..

Los hallazgos obtenidos se procesaron para su estudio estadístico en una computadora IBM. 4341 utilizándose un lenguaje de programación FORTRAN-IV nivel F.

Los estudios estadísticos realizados fueron: conteo de las muestras, cálculo de porcentajes, determinación de medias aritméticas, desviaciones típicas y cálculo de probabilidades de diferencias de medias intergrupos. Todos estos estudios se realizaron con respecto a pesos de los animales al comenzar el experimento, es decir, a las ocho semanas de vida, peso al final de la misma y supervivencias, relacionando los resultados

de la serie A (inyectados) con los de la serie B (control).

Los resultados obtenidos de la serie A se agruparan en distintos apartados según los hallazgos (animales que desarrollaron tumor en cavidad abdominal, craneal, y en sitios distintos de la cavidad abdominal y craneal, dos o más tumores distintos, y animales que no desarrollaron tumor), investigando los parámetros estadísticos citados anteriormente entre estos grupos.

72

Fig A



HOSPITAL CLÍNICO DE SAN CARLOS
CALLE 44
FACULTAD DE MEDICINA
MADRID
INSTITUTO DE ANATOMÍA Y PATOLOGÍA
PRINCIPAL DE BULLÓN

Fecha:

Nº. Histol:

CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL

Código: _____ Animal Nº: _____

Especie: _____ Sexo: _____ Peso: _____ g.

Supervivencia desde el comienzo del experimento (semanas): _____

Tratamiento: _____

Organo	Est. macr	Est. hist	Hallazgos autopsícos
Cabeza			
ENC			
Piel			
Laringe			
Tráquea			
Esófago			
Tiroides			
Corazón			
Timo			
Pulmón			
Hígado			
Páncreas			
Bazo			
RIÑÓN			
SE			
Estómago			
Intestino			
Vagina			
Utero			
Ovario			
Mama			
Testículo			

Hallazgos histológicos

72 Gis

RESULTADOS

RESULTADOS DE LA SERIE A-I

Esta serie está constituida por 44 ratas macho, a las que a partir de la octava semana de vida se le inyectaron 24 mg/kg. de peso de M.N.U. cada siete días, durante 24 semanas según modo y pautas señalados en el apartado de material y métodos.

De estos animales dos murieron antes de recibir la última dosis de carcinógeno; al realizar la autopsia de los mismos. no se observó ningún crecimiento tumoral visible. Tres fueron ampliamente devorados por los animales vivos que compartían la jaula, y en estos no pudo descartarse la existencia o no de tumor. Estos animales no han sido considerados válidos, por lo que el número de ratas de ésta serie se redujo a 39. El 82% de ellas desarrollaron tumores y la supervivencia de las mismas estuvo comprendida entre 36 y 230 días con una media de 115 días.

Los hallazgos de esta serie los hemos agrupado con fin de facilitar la exposición de los mismos, en los siguientes apartados.

I-a.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL.

I-b.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN CAVIDAD CRANEAL.

I-c.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN SITIOS DISTINTOS DE LA CAVIDAD ABDOMINAL Y CRANEAL.

I-d.- ANIMALES QUE DESARROLLARON DOS O MAS TIPOS TUMORALES DISTINTOS.

I-e.- ANIMALES QUE NO DESARROLLARON TUMOR.

I-a.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN LA CAVIDAD ABDOMINAL

Hubo 23 animales (casos 1, 2, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 30, 31, 34, 35, 36, 38), correspondientes a un 58.4% que desarrollaron tumor en el interior de la cavidad abdominal.

La supervivencia de estos animales estuvo comprendida entre 36 días y 203 días siendo la media de 114.6 días.

El estudio histológico de cada uno de los tumores demostró que todos ellos correspondían a schwannomas malignos. Las características generales son presentadas en la Tabla I.

El mayor de los tumores desarrollados medía 10x8x7 cm. (caso 26), y hubo tres casos (6, 23, 34), en los que no se vió masa tumoral definida en el estudio macroscópico. Se talló de la próstata que aparecía engrosada hasta dos veces su tamaño normal. El estudio histológico de estas zonas demostró en los tres casos, la presencia de un schwannoma maligno (Fig: 31, 32, 33, 34). En ocho animales (casos 1, 2, 4, 13, 16, 21, 24, 31) al realizar la autopsia se evidenció ascitis hemorrágica entre 5 y 15 cc.

Nueve de los tumores evidenciados en el estudio macroscópico

estaban situados en el hemiabdomen inferior en relación con órganos pélvicos (casos 1, 3, 19, 20, 21, 26, 30, 35, 36)(fig: 1, 2), Ocho se encontraban firmemente adheridos a planos musculares de la pared abdominal anterior (casos 2, 4, 11, 12, 15, 24, 31, 38), (fig: 4,5) dos se encontraban unidos a asas intestinales (casos 13, 18), y uno englobaba grandes vasos abdominales (caso 16).

Las características macroscópicas de estos tumores eran similares. Su superficie externa era irregular, de coloración rojiza brillante, con áreas de necrosis y hemorragia. La consistencia en la mayoría de los casos era blanda y se rompía fácilmente, al corte frecuentemente presentaban un aspecto multiquístico; esponjoso, con múltiples zonas de necrosis y hemorragia(fig: 3).

En el estudio con microscopio óptico todos los casos fueron diagnosticados de schwannomas malignos. En doce (casos 3, 4, 11, 13, 15, 16, 18, 20, 24, 34, 36, 38) las características histopatológicas eran las habituales en este tipo tumoral (fig: 6, 7, 8, 9, 10, 11). Las células proliferantes en haces, son fusiformes, con núcleo ovalado y cromatina de distribución periférica. Hay invasión de tejidos adyacentes; mitosis frecuentes, con zonas de necrosis y hemorragia (fig: 12, 13). En seis (casos 1, 2, 12, 21, 30, 31), los tumores presentaban zonas con un patrón histológico poco diferenciado y anárquico, constituido por células con marcadas atípicas, hipercromatismo, mitosis, núcleos vacuolados etc., no es infrecuente encontrar en otros casos células multi-

nucleadas marcadamente pleomorficas, (fig: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23). El estroma tumoral es escaso, aunque no siempre; tambien suelen presentar una reacción inflamatoria inespecifica con abundantes linfocitos y células plasmaticas (fig: 24) sobre todo en las zonas de invasión tumoral a planos adyacentes. En todos los casos se observa abundantes áreas de necrosis y hemorragia.

El estudio con microscópio electrónico, de cuatro de estos casos de difícil interpretación al microscópio óptico; muestra hallazgos significativos para realizar del diagnostico de schwannoma. Se observaron las características propias de la célula de Schwann tales como contorno celular abundante, citoplasma poco denso, con escasa dotación organular, presencia de escasos microfilamentos y fenómenos de pinocitosis poco aparentes. Tambien es frecuente, la presencia de plexos constituidos por procesos citoplasmaticos de la célula de Schwann, envueltos en membrana basal que puede ser multilaminar. Es característico encontrar en el intersticio celular, colagena fibrosado. periodo largo, constituyendo acúmulos organizados, formando "los cuerpos de Lusse" (fig: 35, 26, 27a, 27b, 28, 29, 30).

Los dos casos restantes no pudieron ser estudiados al microscópio electrónico por razones tecnicas, si bien sus características ópticas, analogas a loa anteriores, nos hicieron concluir que estabamos ante el mismo tipo tumoral.

Los otros cinco casos (6, 19, 23, 26, 35) presentaban una

estructura histologica en la que las células tumorales de aspecto fusiformes, con núcleos ovalados, hipercromáticos y atípicos, citoplasma eosinófilo de límites mal definidos, se disponen en haces entrecruzados adoptando en algunos casos, un aspecto estoriforme (fig: 35, 36, 37, 38, 39). Estas áreas de densidad celular alta se alternaban con otras con abundante reacción fibrosa, o degeneración mixoide, (fig: 40), así como áreas en las que los núcleos se disponen en empalizadas, (fig: 35, 36).

No se han observado en ninguno de los casos estructuras organoides, de diferenciación nerviosa bien definida, aunque es frecuente en muchos casos encontrar grupos de troncos nerviosos de tamaño y forma variable, (fig: 41, 42, 43, 44).

Tan solo dos animales (casos 11, 34) desarrollaron conjuntamente otro tipo tumoral: en los dos casos correspondían a oligodendrogliomas (fig: 45).

Los hallazgos de este grupo quedan reflejados en la grafica I.

I-b.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN LA CAVIDAD CRANEAL

Hubo diez animales (casos 5, 7, 10, 11, 17, 22, 25, 28, 29, 34) que mostraban tumores en la cavidad craneal. La supervivencia estuvo comprendida entre 60 y 230 días, siendo la media de 147.9 días.

Uno de ellos (caso 5), presentó un tumor intrahemisférico

derecho de 0.3x0.3x0.2 cm. de coloración blaquecina y consistencia blanda, aparentemente bien delimitado del parenquima adyacente. En otro caso (10) el cerebro estaba totalmente desestructurado, de consistencia blanda, rompiendose con facilidad a la extracción. El resto de los casos (7, 11, 17, 22, 25, 28, 29, 34), no mostraban alteraciones macroscópicas significativas en la superficie cerebral al extraer el encefalo.

Al estudio microscópico todos los tumores de este grupo correspondían a oligodendrogliomas, que se manifiestan en los cortes histologicos de una forma monotonas como una proliferación celular de límites bien definidos, citoplasma claro y núcleos centrales, de cromatina densa (fig: 45, 46, 47, 48, 49, 50); en algunos casos existe menor diferenciación celular con formas más abigarradas, intensa proliferación vascular, necrosis y hemorragia. El parenquima cerebral adyacente aparecia edematoso y congestivo.

En dos casos (11, 34), se desarrollo un segundo tumor que correspondia a schwannoma maligno intraabdominal, cuyas características han sido comentadas en el apartado anterior, (fig: 31, 32).

Los hallazgos de este grupo son reflejados en la grafica II.

I-c.- ANIMALES QUE DESARROLARON TUMOR EN SITIO DISTINTO
DE LA CAVIDAD ABDOMINAL Y CRANEAL

Tan solo hubo un caso (nº9) en este grupo. El animal sobrevivio 88 dias despues de recibir la ultima dosis de carcinogeno.

El peso inicial de este animal al comenzar la adminstracion del carcinogeno era de 260grs, y su peso al final de la vida de 328grs.. La autopsia revelo una gran adiposidad peritoneal, congestion visceral, hipertrofia de prostata, asi, como discreta cardiomegalia.

El estudio histologico demostro una tumoracion subendocardica que crece hacia la cavidad ventricular izquierda, tambien hacia el espesor del miocardio displacerando las celulas musculares cardiacas. Dicha tumoracion adopta un patron estoriforme de alta densidad celular, constituida por celulas fusiformes y citoplasma escaso, eosinofilo, de limites mal definidos. Se observan multiples espacios quisticos vacios. Algunos vasos de pequeño tamaño presentan hialinizacion y engrosamiento de su pared. Las areas de necrosis y hemorragia son escasas. Fue diagnosticado de schwannoma maligno cardiaco. (Fig. 51 y 52).

Los hallazgos de este grupo quedan reflejados en la grafica III

I d.- ANIMALES QUE DESARROLLARON DOS O MAS TIPOS TUMORALES
DISTINTOS.

Hubo dos animales que desarrollaron dos tipos tumorales distintos (casos 11 y 34). La supervivencia fue de 116 días y 199 días respectivamente.

Uno de ellos (n°11) desarrollo un tumor abdominal de 5x 4x3 cm. que se adhería a los planos musculares, de consistencia blanda, multiquístico, con múltiples zonas de necrosis y hemorragia. Fue diagnosticado de schwannoma maligno intraabdominal. El estudio del cerebro mostro un oligodendroglioma de localización periventricular. (Fig. 45 y 47).

El otro caso (n°34), no desarrollo masa tumoral visible; al estudio histológico de la próstata que se encontraba aumentada de tamaño, fue observado un Schwannoma maligno (Fig. 32) En cerebro lo mismo que en el caso anterior, coexistía un oligodendroglioma situado en región subependimaria. (Fig.46)

Las características macroscópicas y microscópicas de estos casos , han sido comentadas en los apartados I.a y I-b.

Los hallazgos de este grupo son expuestos en la gráfica IV.

I-e. ANIMALES QUE NO DESARROLLARON TUMORES.

Los animales que no desarrollaron tumor en esta serie, fueron siete (casos 8,14,27,32,35,37,39). La supervivencia de los mismos estuvo comprendida entre 40 días y 175, siendo la media de 88,6 días .

Tres de estos animales (n8,32,37) presentaron al realizar la autopsia una bronconeumonia bilateral masiva. Dos de ellos como unico hallazgo, presentaron hipertrofia de las vesiculas seminales. En el resto de los animales no se encontraron hallazgos significativos al realizar la autopsia.

El resumen de los hallazgos de este grupo son reflejados en la grafica V.

ESTUDIO ESTADISTICO

Como ya indicamos en el apartado dematerial y metodos estos resultados fueron procesados en una computadora IBM 4341 utilizando un lenguaje de programacion FORTRAN- IV nivel F. Realizandose calculo de porcentajes, determinacion de medias aritmaticas, desviacion tipica y calculo de probabilidades de las diferencias de medias entre los grupos en que se dividió esta serie segun sus hallazgos.

Los resultados obtenidos son espuestos en la grafica VI.

G R A F I C A - I

ANIMALES QUE PRESENTAN TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROSC. EN CAV. ABDOMINAL	CARAC. MICROSC. NO ABDOMINALES
1	60	240	460	Tum. abd. de 6x5x4 cm. unido a la pared anterior y organos pélvicos. Múltiples formaciones nodulares en mesenterio. Hemoperitoneo.	Schwannoma maligno.	
2	153	240	350	Tum. abd. de 6x5x4 cm, consistencia blanda unido a pared muscular anterior. Ascitis y hemoperitoneo.	Schwannoma maligno.	
3	148	290	260	Tum. en cav. abdominal inferior en relación con próstata de 3x2x2 cm.	Schwannoma maligno	
4	58	240	460	Tum. abd. unido a pared anterior de 4x2x7 cm. con metastasis hepáticas. Hemoperitoneo.	Schwannoma maligno.	
6	150	240	350	La próstata aparece engrosada y endurecida.	Schwannoma maligno.	
11	116	260	340	Tum. abd. de 5x4x3 cm. unido a la pared anterior dcha. de aspecto multiquístico con zonas de necrosis y hemorragia.	Schwannoma maligno.	Oligodendroglioma.

G R A F I C A - I
ANIMALES QUE PRESENTAN TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL (Cont. 2)

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARC. MICROSC. EN CAV. ABDOMINAL	CARC. MICROSC. NO ABDOMINALES
12	165	260	280	Tum. abd. de 6x7x6 cm. de consistencia firme, unido a pared anterior, con multiples formaciones nodulares en mesenterio.	Schwannoma maligno.	
13	138	260	360	Tum. abd. 6x5x4 cm. multiquistico adherido a asas intestinales. Ascitis y hemoperitoneo.	Schwannoma maligno.	
15	155	265	300	Tum. abd. 10x8x6 cm. multiquistico, consistencia blanda adherido a pared muscular anterior.	Schwannoma maligno.	
16	60	265	460	Tum. abd. de 6x5x3 cm. engloba grandes vasos abdominales, con zonas de necrosis y hemorragia. Ascitis y hemoperitoneo.	Schwannoma maligno.	
18	36	265	270	Tum. abd. de 5x4x2 cm. adherido a asas intestinales, consistencia firme.	Schwannoma maligno.	
19	41	260	310	T. abd. a nivel de prostatata de 1x3x2 cm. provoca retención urinaria con hidronefrosis bilateral.	Schwannoma maligno.	

G R A F I C A - I
ANIMALES QUE PRESENTAN TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL (Cont. 3)

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROS. EN CAV. ABDOMINAL	CARAC. MICROS. NO ABDOMINALES
20	70	260	390	T. abd. de 7x6x5 cm, que engloba órganos pelvianos.	Schwannoma maligno.	
21	90	260	400	T. abd. de 6x7x4 cm. que engloba órganos pelvianos. Hemoperitoneo.	Schwannoma maligno.	
23	203	260	300	Prostata engrosada y endurecida.	Schwannoma maligno.	
24	50	220	410	T. abd. de 4x3x2 cm. unido a pared anterior con metastasis en mesenterio. Ascitis y hemoperitoneo.	Schwannoma maligno.	
26	180	220	330	T. abd. de 10x8x7 cm. multiquístico en relación con órganos pelvianos.	Schwannoma maligno.	
30	154	220	290	T. abd. de 3x2x1 cm. en relación con órganos pelvianos.	Schwannoma maligno.	
31	75	220	400	T. abd. multiquístico de 2x6x5 cm. adherido a pared muscular anterior. Gran cantidad de ascitis.	Schwannoma maligno.	

G R A F I C A - I
ANIMALES QUE PRESENTAN TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL (Cont..4)

CASO	*SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 6° SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROSC. EN CAV. ABDOMINAL	CARAC. MICROSC. NO ABDOMINALES.
34	75	160	370	No se observa tumor macroscopico, se talla a nivel de próstata que aparece engrosada.	Schwannoma maligno.	Oligodendroglioma.
35	135	160	400	T.abd. de 4x3x3 cm. en relación con órganos pélvicos.	Schwannoma maligno.	
36	113	160	300	T.abd. de 4x3x2 cm. con zonas de hemorragia y necrosis en relación con órganos pélvicos.	Schwannoma maligno.	
38	90	160	440	Masa tumoral a nivel del hipocondrio izdo. de 3x3x2 cm. multifistula adherida a planos musculares anteriores.	Schwannoma maligno.	

* La supervivencia indica el n° de días vividos desde la fecha de la última dosis de carcinógeno administrado.

G R A F I C A - II
ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN CAVIDAD CRANEAL

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8° SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROS. EN CAV. CRANEAL	CARAC. MICROS. NO CRANEAL
5	60	340	420	Tum. intrahemostferico derecho 0'4x0'3x0'2 cm.	Oligodendro- glioma	
7	80	340	390	S.H. macroscopicos significativos.	Oligodendro- glioma.	
10	225	260	300	Cerebro totalmente desestructurado	Oligodendro- glioma	Schwannoma ma- tigno intraabd.
11	116	260	340	S.H. macroscopicos significativos.	Oligodendro- glioma.	
17	98	265	280	S.H. macroscopicos significativos	Oligodendro- glioma.	
22	75	260	410	S.H. macroscopicos significativos	Oligodendro- glioma.	
25	189	220	390	S.H. macroscopicos significativos	Oligodendro- glioma.	
28	230	220	400	S.H. macroscopicos significativos	Oligodendro- glioma.	
29	210	220	340	S.H. macroscopicos significativos	Oligodendro- glioma.	
34	196	160	270	S.H. macroscopicos significativos	Oligodendro- glioma.	Schwannoma ma- tigno intraabd.

G R A F I C A - III
ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN SITIO DISTINTO DE CAVIDAD ABDOMINAL Y CEREBRAL

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARACTERES MICROSCOPICOS
9	88	260	300	Sin hallazgos macros- cópicos significati- vos.	Schwannoma maligno cardíaco.

G R A F I C A - I V

ANIMALES QUE DESARROLLARON DOS O MAS TIPOS DE TUMORES HISTOLOGICAMENTE DISTINTOS

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8° SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE LOS TUMORES
11	116	260	340	Schwannoma maligno intraabdominal. Oligodendroglioma.
34	196	160	370	Schwannoma maligno intraabdominal. Oligodendroglioma

G R A F I C A - V
ANIMALES QUE NO DESARROLLARON TUMOR

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	HALLAZGOS DE AUTOPSIA
8	40	260	270	Bronconeumonía bilateral masiva
14	98	260	390	Hipertrofia de vesículas seminales
27	123	220	330	Hipertrofia de vesículas seminales
32	75	190	230	Bronconeumonía bilateral masiva
35	66	190	210	Sin hallazgos
37	175	160	480	Bronconeumonía bilateral
39	45	160	190	Sin hallazgos

G R A F I C A - VI

	Nº CASOS	\bar{X} PESO 8º SEMANA DE VIDA EN GR.	\bar{X} PESO AL FINAL DE LA VIDA EN GR.	\bar{X} SUPERVIVENCIA DIAS	%
SERIE AI	39	$\bar{X}=229,744 \pm 36,200$	$\bar{X}=350,513 \pm 72,437$	$\bar{X}=115,718 \pm 57,150$	
T. CAVIDAD ABDOMINAL	23	$\bar{X}=231,957 \pm 37,165$	$\bar{X}=357,826 \pm 62,519$	$\bar{X}=114,609 \pm 51,767$	58.4%
T. CAVIDAD CRANEAL	10	$\bar{X}=234,500 \pm 31,837$	$\bar{X}=360,000 \pm 41,633$	$\bar{X}=147,900 \pm 68,071$	25.6%
ANIMALES SIN TUMOR	7	$\bar{X}=205,714 \pm 52,370$	$\bar{X}=321,428 \pm 120,890$	$\bar{X}=88,857 \pm 47,775$	17.8%

El cálculo de probabilidades de las diferencias de medias intergrupo, indica que existen diferencias significativas con respecto a la supervivencia de los animales que desarrollaron tumor en cavidad craneal en relación con los animales de esta serie que no desarrollaron tumor.

$P = 0.021.$

Fig. 1.- Aspecto macroscópico de neoformación abdominal inducida experimentalmente por N.M.U., localizada en hemiabdomen inferior. Observe el tamaño extraordinario alcanzado y el desplazamiento de las vísceras abdominales. Supervivencia tras la iniciación de la administración del carcinógeno 90 días (Schwanoma intraabdominal, serie AI nº21).

92



Fig. 2.- Ejemplo de neoformación localizada en hemiabdomen inferior con múltiples áreas hemorrágicas (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°20).

Fig. 3.- Aspecto macroscópico de la superficie de corte de una neoplasia inducida con N.M.U. Se observa un aspecto abigarrado con zonas necroticas y hemorragias intersticiales y límites irregulares. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°16).



Fig. 4.-Ejemplo del aspecto macroscópico de una de las neoformaciones de moderado tamaño, que en este caso esta relacionada con el bazo, aunque aparentemente esta bien delimitada había areas fuertemente adheridas a planos musculares. Al corte era multi-quística. (Schwannoma intraaabdorninal , serie AI n°38).

Fig. 5.- Mismo caso de la figura anterior con omisión de los planos posteriores, observándose la relación de la neoplasia con bazo (Serie AI n°38).

96

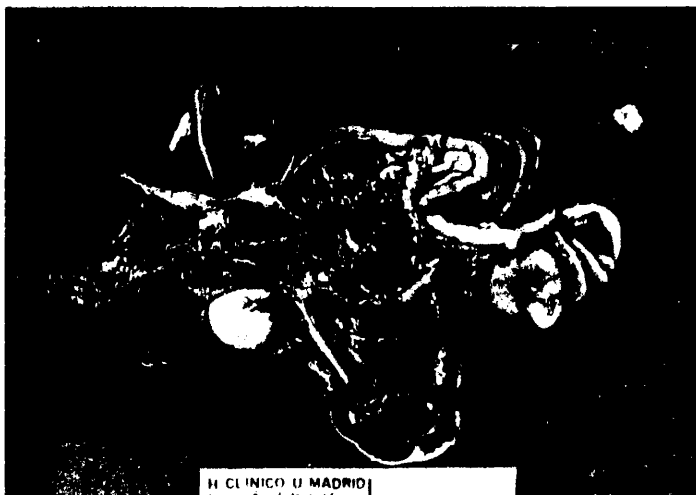
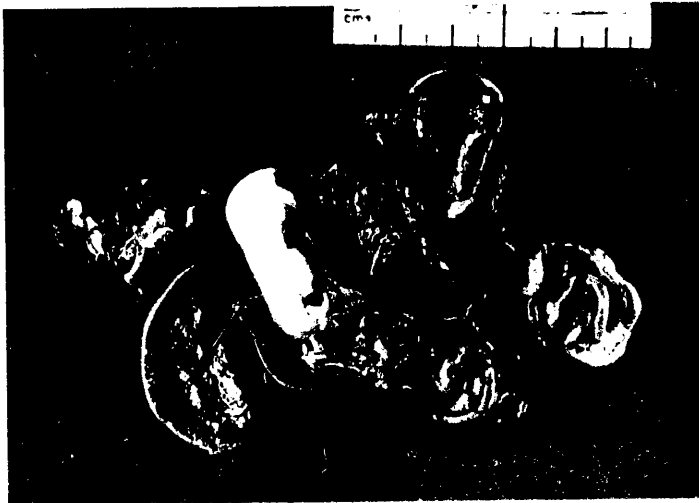


Fig. 6.- Los tumores neuroectodémicos inducidos en el S.N.P. fueron Schwannomas. La imagen microscópica frecuente es la observada aquí en la que es manifiesta la disposición fascicular de las células neoplásicas que producen imágenes en ondas. (Schwannoma maligno intraabdominal., serie AI n°20, H.E. , apro. 100 x).

Fig. 7.- Mismo caso de la figura anterior. Existe polimorfismo nuclear hipercromático y nucleolos prominentes. El citoplasma celular es fibrilar y eosinofílico. Límites celulares imprecisos. Se observan los caracteres morfológicos generales de las células neoplásicas. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°20, apro. 350 x).

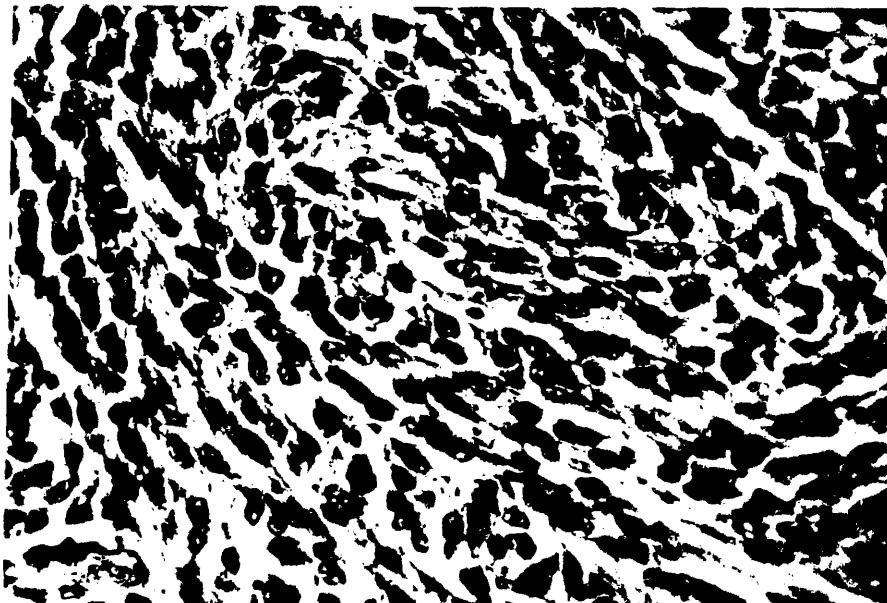
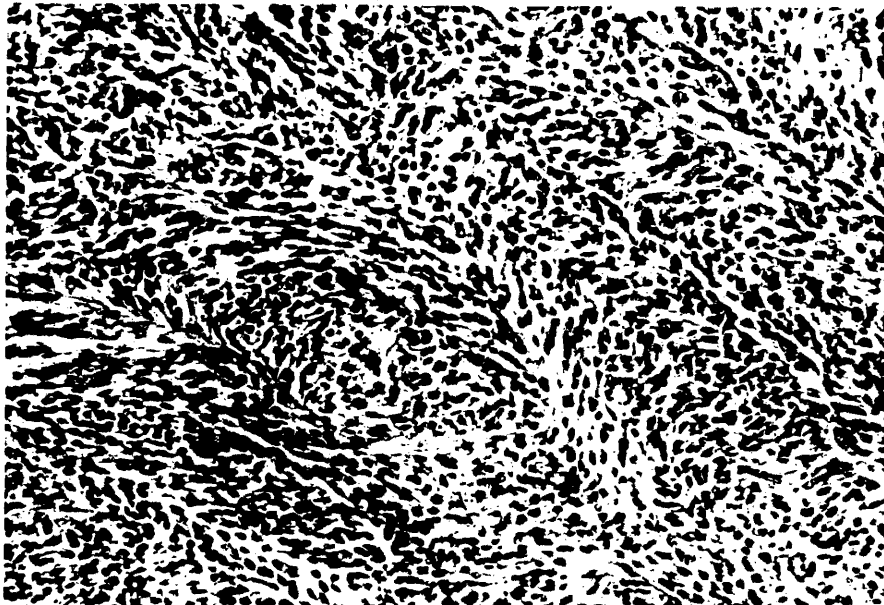


Fig. 8.- Característica formación de focos de degeneración quística que constituye un detalle morfológico muy frecuente en las neoplasias del tejido nervioso inducidas experimentalmente por M.N.U. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°13, H.E. apor. 100x).

Fig. 9.- Aspecto morfológico de una de las neoformaciones inducidas. Se observa la estructura fusiforme celular con moderado pleomorfismo nuclear. La trama tumoral es laxa. En otras zonas alternaban con áreas de degeneración quística. (Shwannoma intraabdominal, serie AI n°15, H.E. apro. 350 x).



Fig. 10.- Area microscopica en la que el aspecto celular varía encontrándose nucleos esparcidos hipercromaticos de aspecto linfocitoide y limites celulares imprecisos que ocasionan una trama tumoral laxa. (Schwannoma maligno intraabdominal, Serie AI n°18, H.E., apro. 350 x).

Fig. 11.- Area neoplasica con intensa acumulación de material intersticial que condiciona un aspecto mixoide a la neoformación. (Schwannoma intraabdominal , serie AI n°15, H.E. apro. 350 x).

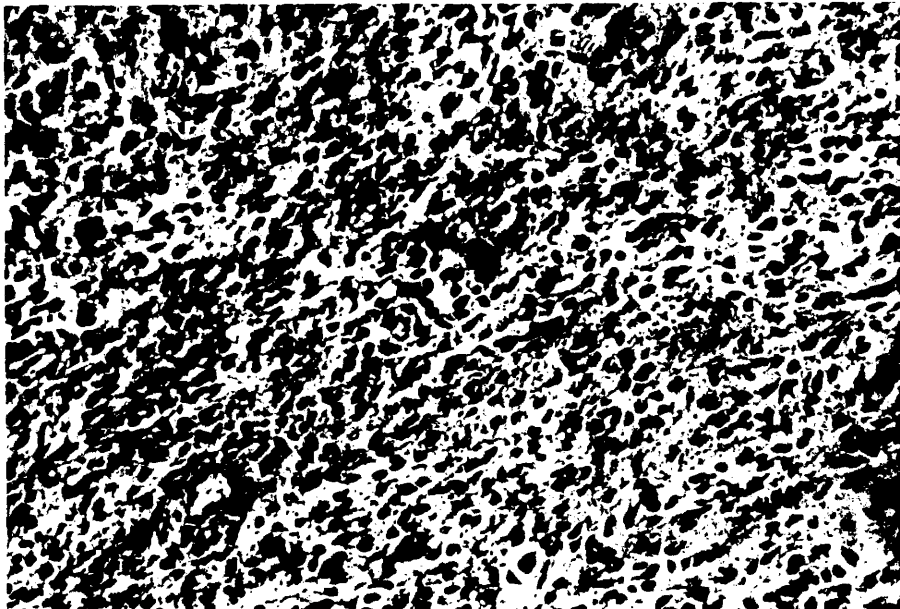


Fig. 12.- Infiltración del tejido muscular esquelético por células neoplásicas de un Schwannoma maligno. (Schwannoma maligno, serie AI nº4, H.E., apro. 350 x).

Fig. 13.- Marcados fenómenos regresivos en el seno de un Schwannoma maligno produciéndose áreas de res-
blandecimiento, hemorragia y necrosis. (Schwan-
noma intraabdominal, serie AI nº6, H.E., apro.
100 x).

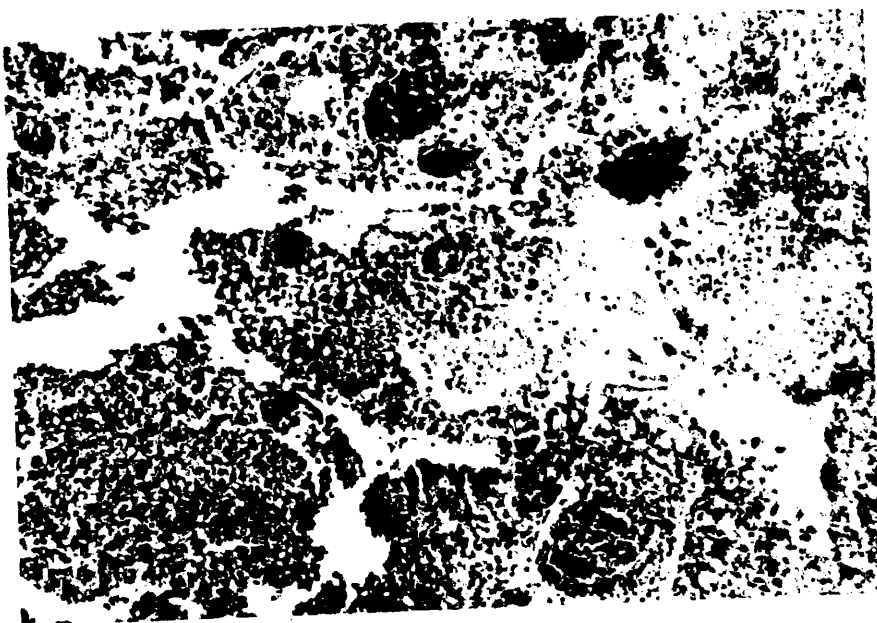
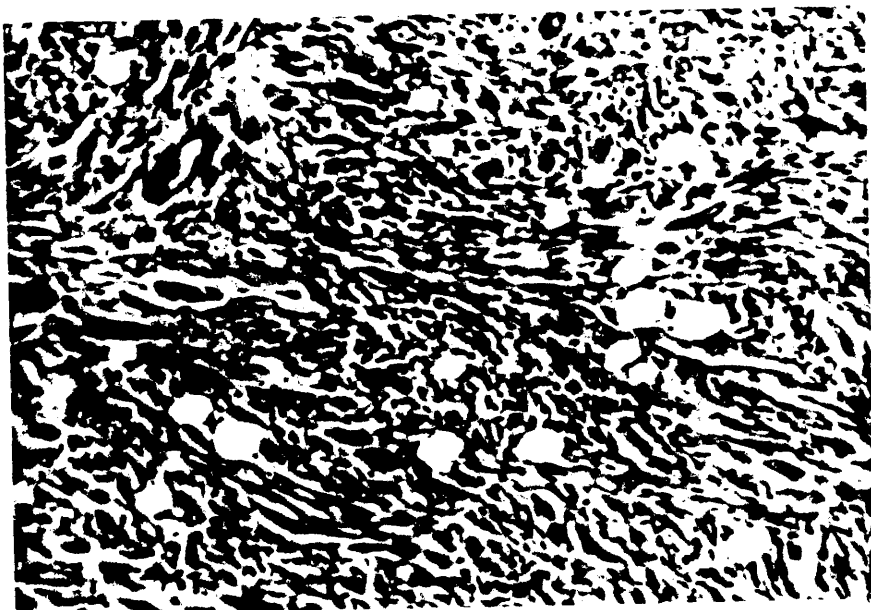


Fig. 14.- Intenso pleomorfismo celular con marcadas atipias nucleares y tendencia a la disposición fascicular de los elementos neoplasicos . (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°1, H.E., apro. 350 x).

Fig. 15.- Mismo caso anterior demostrandose los aspectos bizarros de los nucleos. (Schwannoma maligno, serie AI n°1, H.E., apro. 450 x).

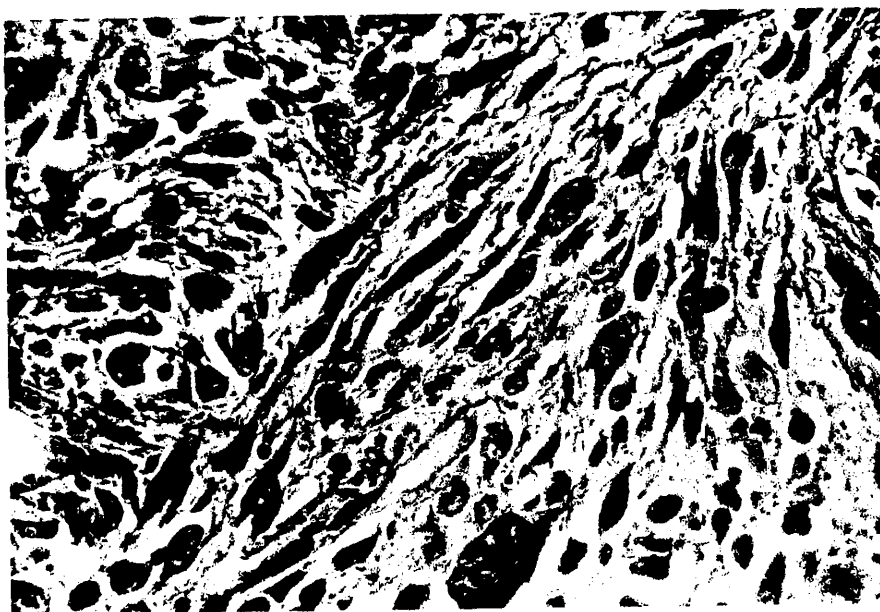
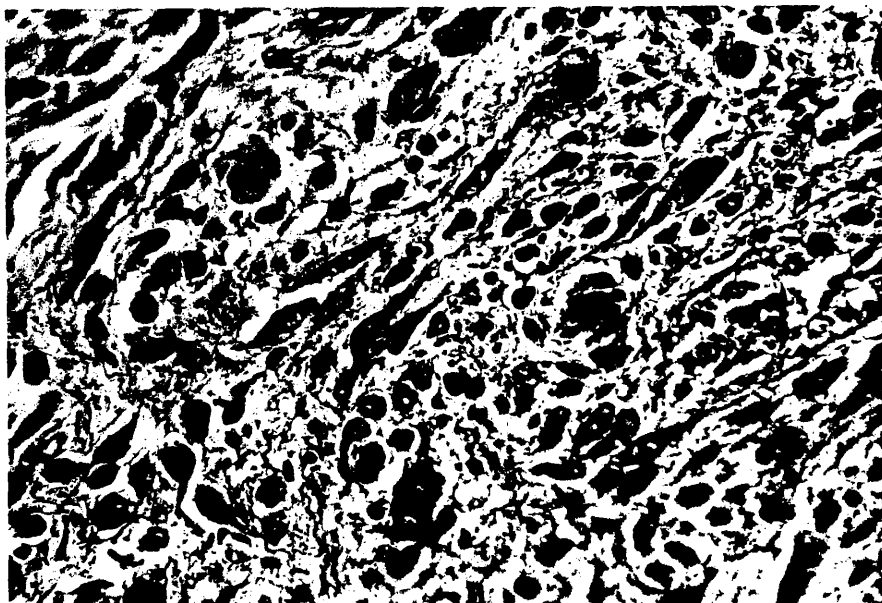


Fig. 16.- Schwannoma maligno cuyas celulas presentan aspecto fusiforme con abundante citoplasma y nucleos pleomorficos. Imagenes de este tipo plantean el diagnostico diferencial con diversos tumores de estirpe nerviosa. (Serie AI n°1, H.E. apro. 350 x).

Fig. 17.- Schwannoma maligno con areas laxas , zonas hemorragicas, observandose algunas celulas tumorales gigantes multinucleadas (Serie AI n°2, H.E. apro. 350 x).

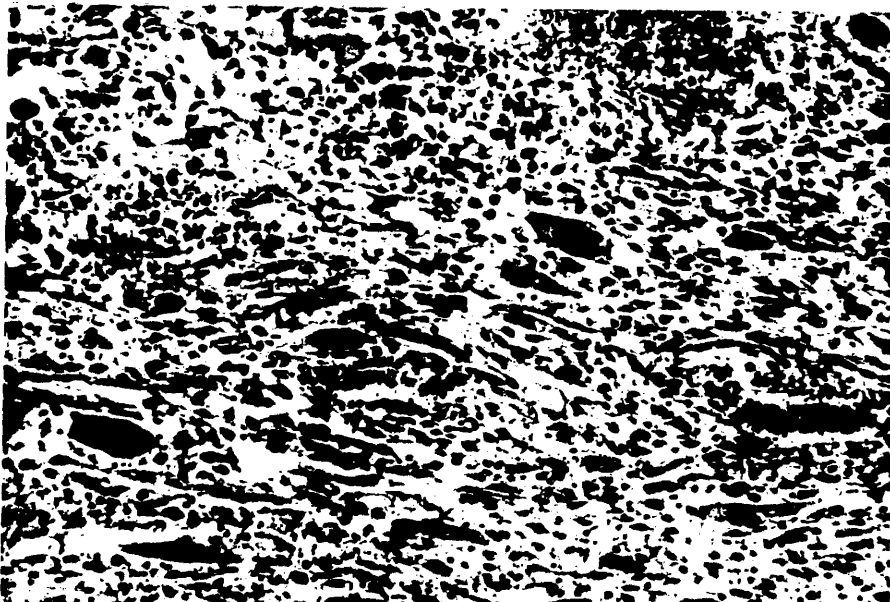
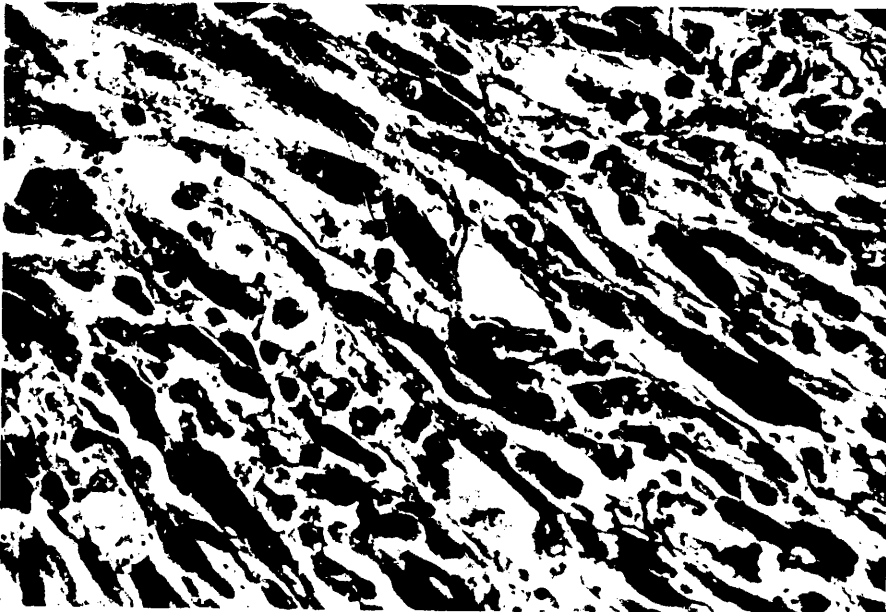


Fig. 18.- Area con abundantes células gigantes multinucleadas con células fusiformes de pequeña talla (Schwannoma maligno, serie AI n°30, H.E. apro. 350 x)'

Fig. 19.- Intensos entrelazamientos de los fascículos de células fusiformes neoplásicas. Observese el pleomorfismo y la existencia de algunas células gigantes multinucleadas. (Schwannoma maligno, serie AI n°30. H.E. apro. 350 x).

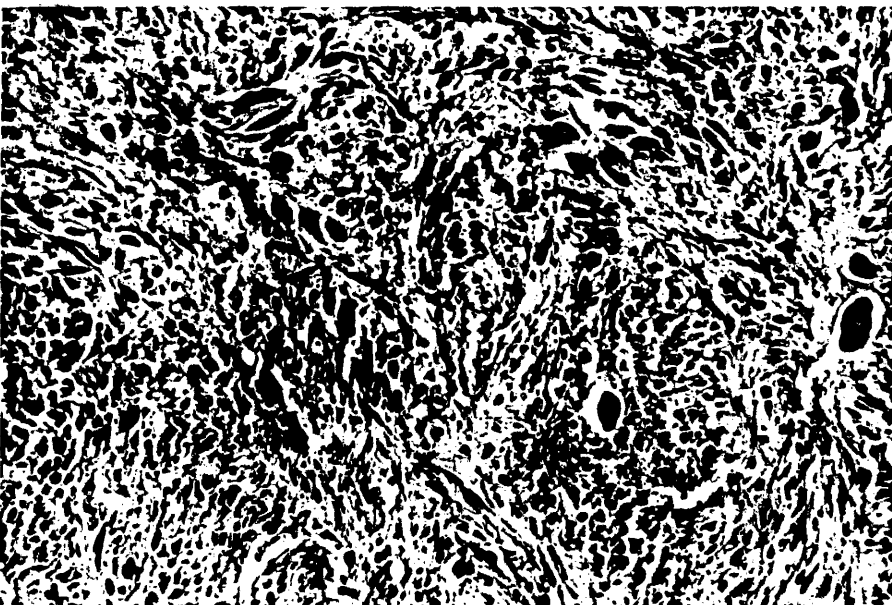
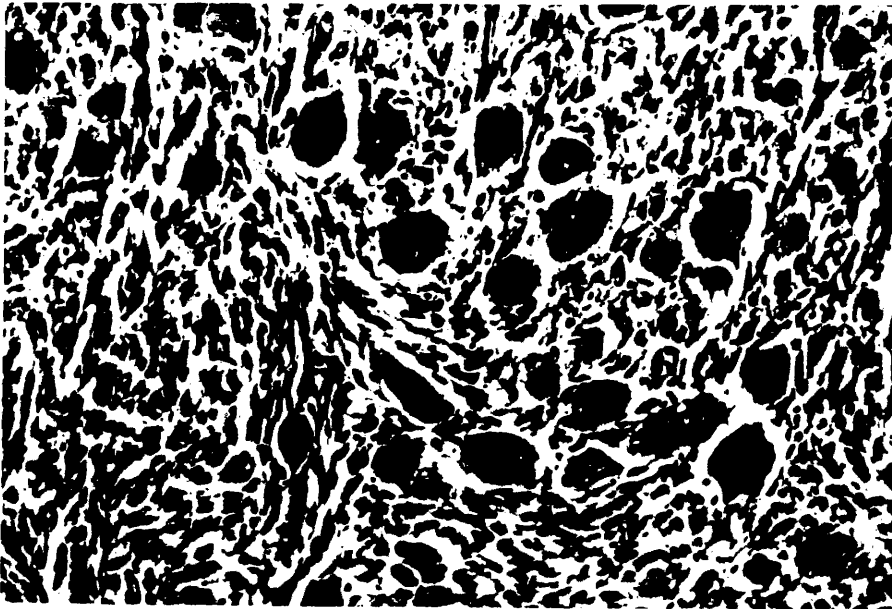


Fig. 20.- Presencia de abundantes celulas gigantes multinucleadas junto a otras de menor tamaño.
(Schwannoma maligno, serie AI n°31, H.É., apro. 350 x).

Fig. 21.- Mismo caso anterior a mayor aumento. Detalle correspondiente a celula gigante con forma de raqueta provista de incontables nucleos.
(Schwannoma intraabdominal , serie AI n°31 H.E. , apro. 450 x).



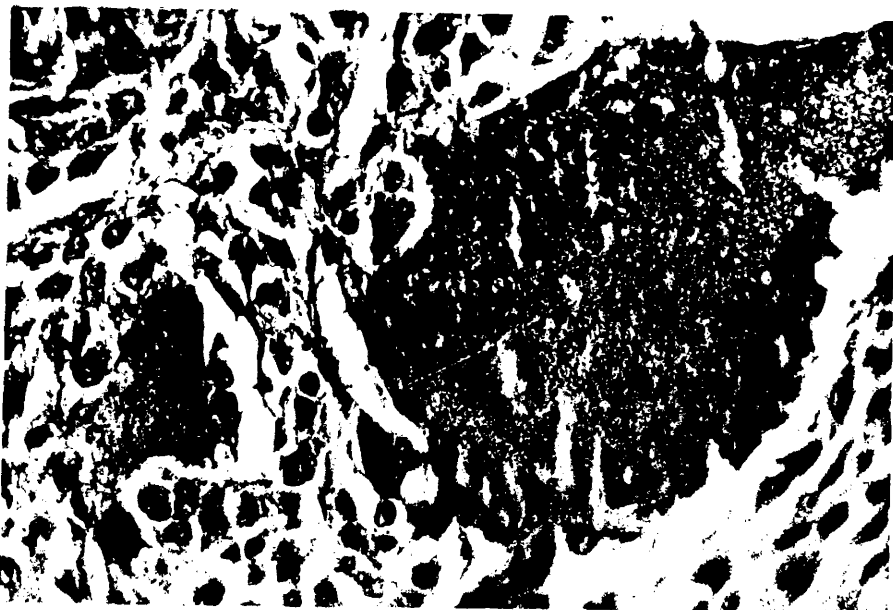
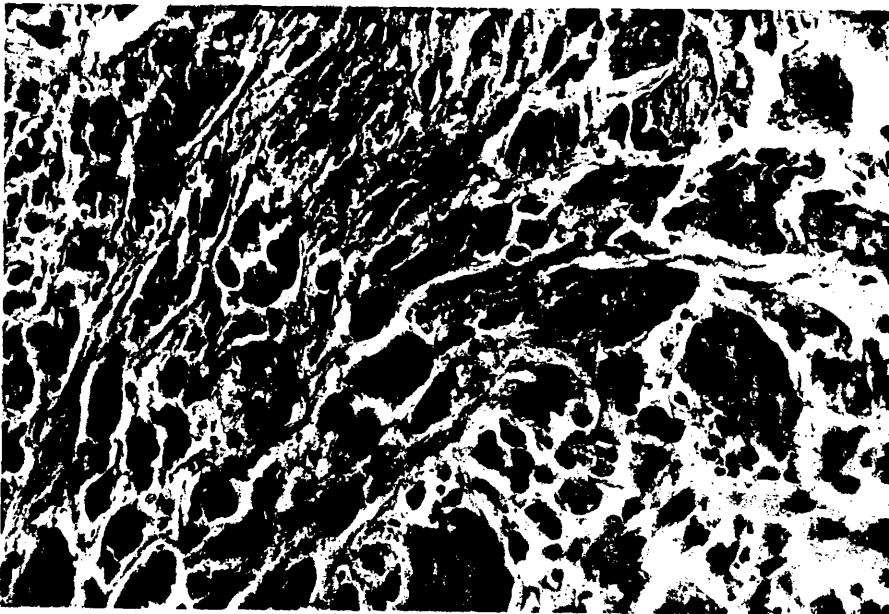


Fig. 22.- Schwannoma maligno con areas laxas y vasos
peominentes y disposición anarquica celular.
Intenso pleomorfismo. (Serie AI n°12, H.E.
apro. 350 x).

Fig. 23.- Aspecto microscopico irregular y anarquico. E-
xisten espacios opticos vacios intercelulares.
Esta zona se continuaba con areas de necrosis.
(Schwannoma maligno, serie AI n°12, H.E. apro.
350 x).

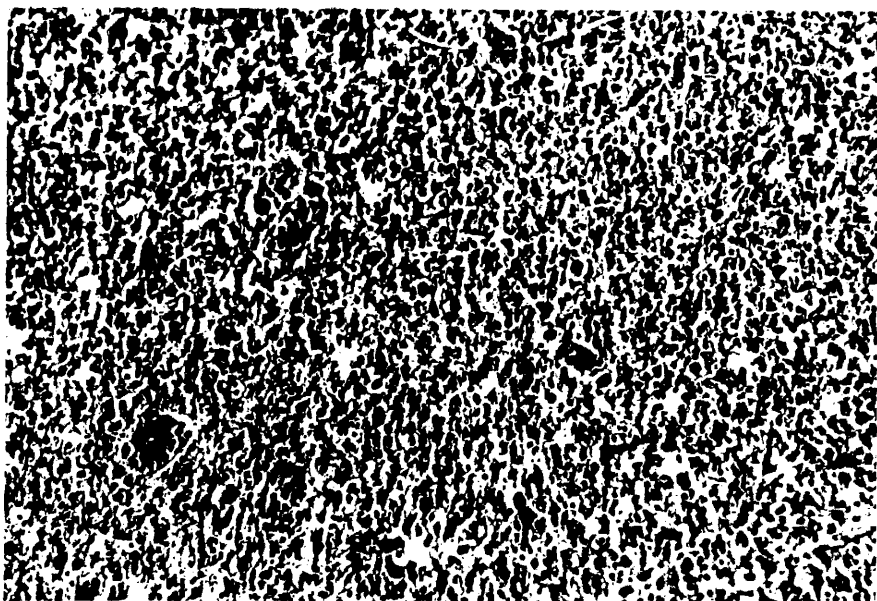
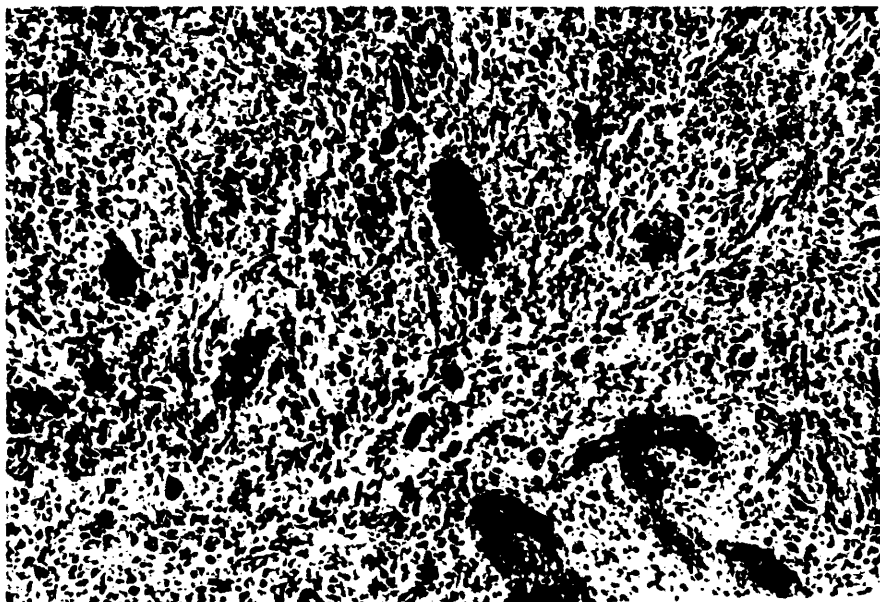


Fig. 24.- Celulas plasmaticas. El reticulo endoplasmico de estas celulas esta muy desarrollado con un material de electrodensidad variada, y un dictiosoma muy desarrollado ubicado en una depresión del borde nuclear. (Schwannoma maligno, serie AI n°2, 14.400 x).



Fig. 25.- Las células neoplásicas muestran numerosos procesos celulares entrelazados . Existe ocasionalmente en el intersticio colágeno de período largo ➤. En el citoplasma hay dilatación del retículo endoplásmico y a veces se observan cuerpos mielínicos *.

(Schwannoma maligno intraabdominal, serie A I n°2, aprox. 7.200 x).

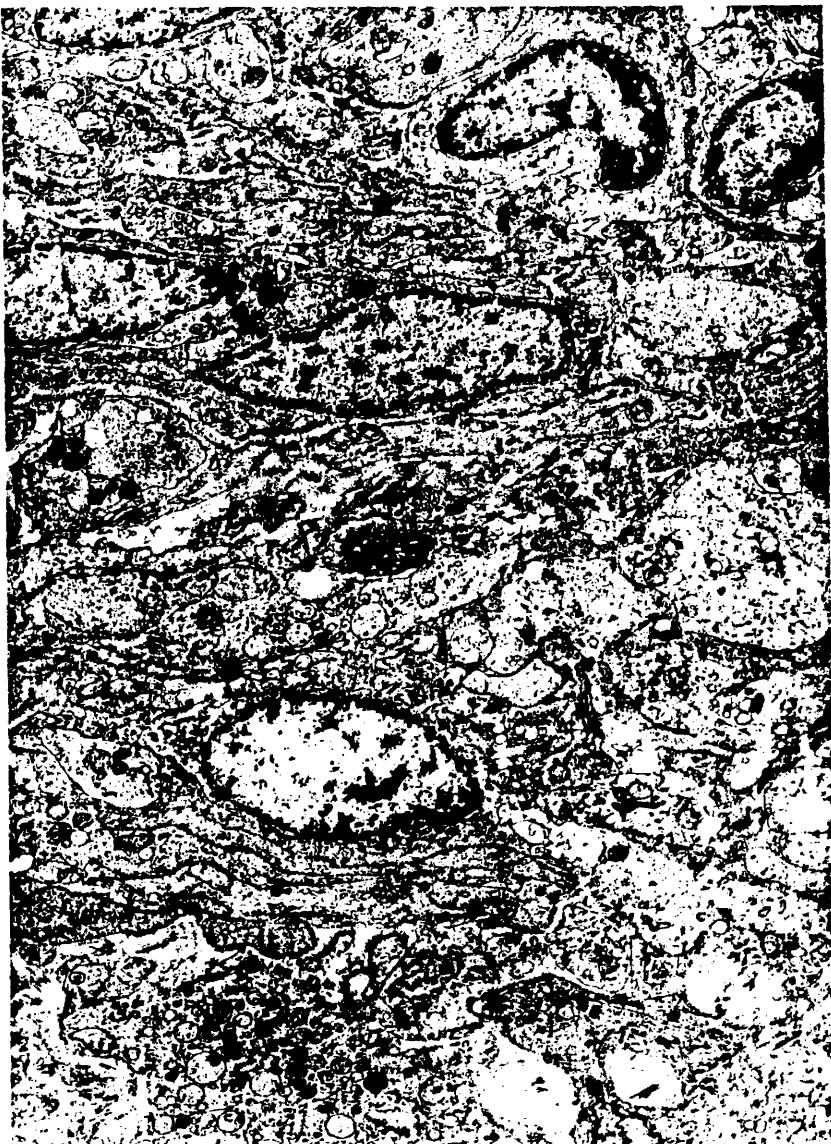


Fig. 26.- Celula neoplasica con membrana basal discontinua → . El reticulo endoplasmico muestra algunas cisternas dilatadas * con contenido finamente granular. . (Schwannoma maligno serie A I n°12 apro. 24.000 x).



Fig. 27 a y b .-

Presencia de inclusiones mieloides
en el citoplasma de las células neoplásicas
En la figura 27 b adoptan una disposición
en huella dactilar. Están rodeadas por
una unidad de membrana (Schwannoma ma-
ligno intraabdominal, serie A I n°12
aprox 24.000x a; aprox. 108.000x b.).

122 .







Fig. 28.- Celulas neoplasicas con caracteres morfologicos de fibroblsto , → vesiculas de pinocitosis y reticulo endoplasmico , capilar sanguineo  y celula endotelial , y linfocito. El espacio extracelular contiene material de baja densidad electronica. (Schwannoma maligno, serie AI n°21, apro. 12.000 x).







Fig. 29.- Existe colagena fibrosa de espacio largo en el intersticio  y abundantes lisosomas en alguna de las células . Gran parte de las prolongaciones celulares aparecen revestidas de forma discontinua por material similar a membrana basal - . (Schwannoma maligno, AI n21, apro 14.000 x).



Fig. 30.- Colagena de periodo normal  en el espacio intercelular de la neoplasia. (Seminoma maligno, serie AI n°21, apro. 40.000 x).

123



Fig. 31.- Infiltración de la prostata por un Schwannoma maligno. La prostata aparecía engrosada hasta dos veces su tamaño habitual. (Serie AI nº6, H.E., apro. 350 x).

Fig. 32.- Infiltración prostática por un Schwannoma maligno. Algunas luces glandulares conservan el epitelio de revestimiento que otras son invadidos por la neoplasia. Simultaneamente este animal desarrollo un oligodendroglioma. (Serie AI nº34, H.E., apro. 350 x).

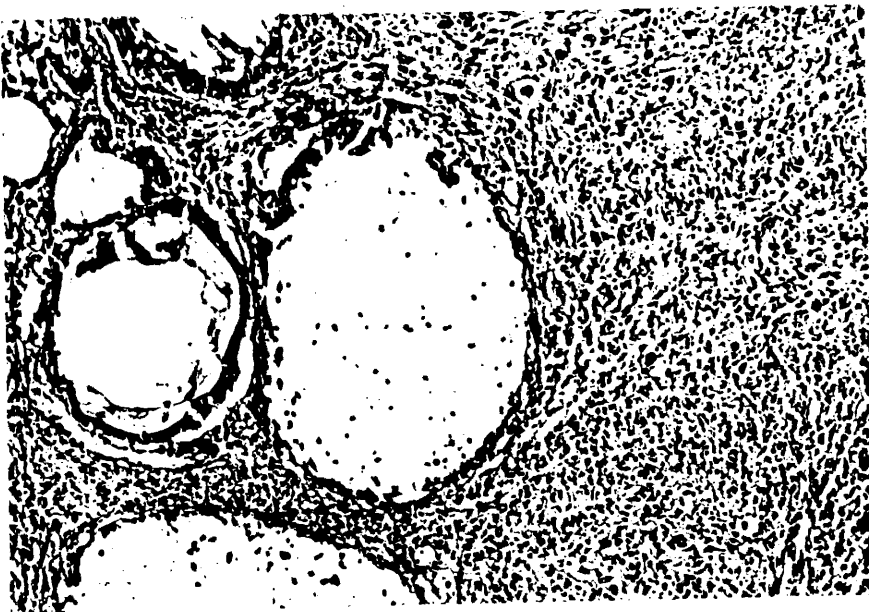


Fig. 33.- Infiltración prostática por un Schwannoma maligno cuyas células fusiformes se disponen en forma de remolinos. (Serie AI : n°23, H.E. apro 100x).

Fig. 34.- Área de infiltración prostática por células neoplásicas de estirpe nerviosa observándose algunos cuerpos amiláceos en el interior de las luces glandulares. (Serie AI n°6, H.E. apro. 100 x).

132

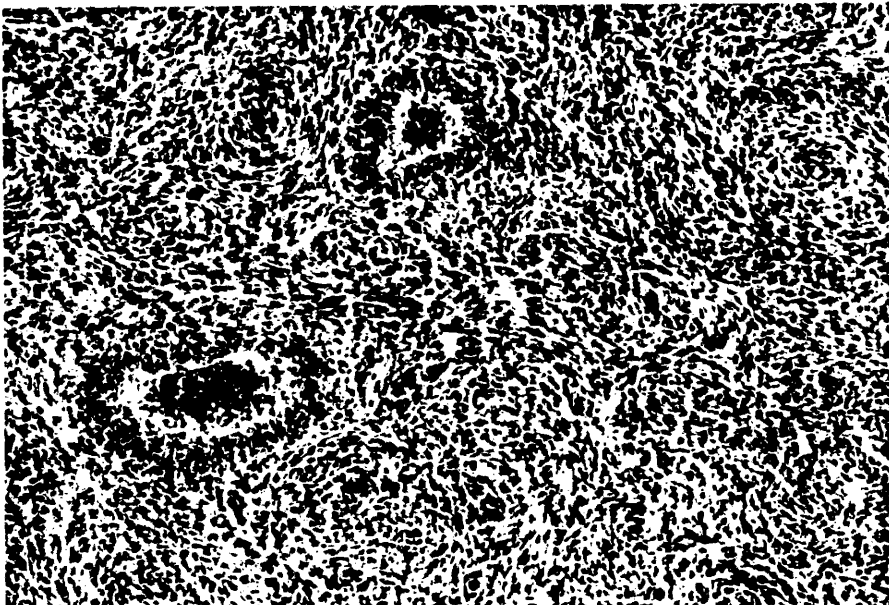


Fig. 35.- Aspecto representativo de un Schwannoma maligno en el que es patente la disposición ondulada característica de estos tumores. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°19, H.E., apro. 350 x).

Fig. 36.- Disposición fasciculada de los haces celulares con moderado pleomorfismo celular. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°19, H.E., apro. 350 x).

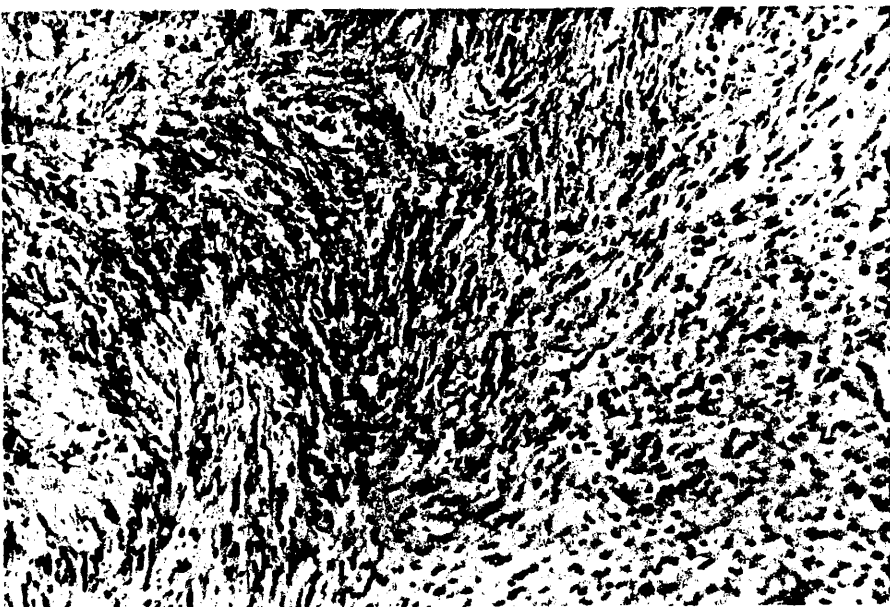


Fig. 37.- Area de alta densidad celular caracterfstica de algunos de estos Schwannomas malignos.
(Schwannoma intraabdominal, serie AI-n°26 ,
H.E. apro. 350 x).

Fig. 38.- Caracterfstica disposici3n morfol3gica observada en estas neoplasias , con fasc3culos celulares entrelazados. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°35 , H.E., apro. 350 x).

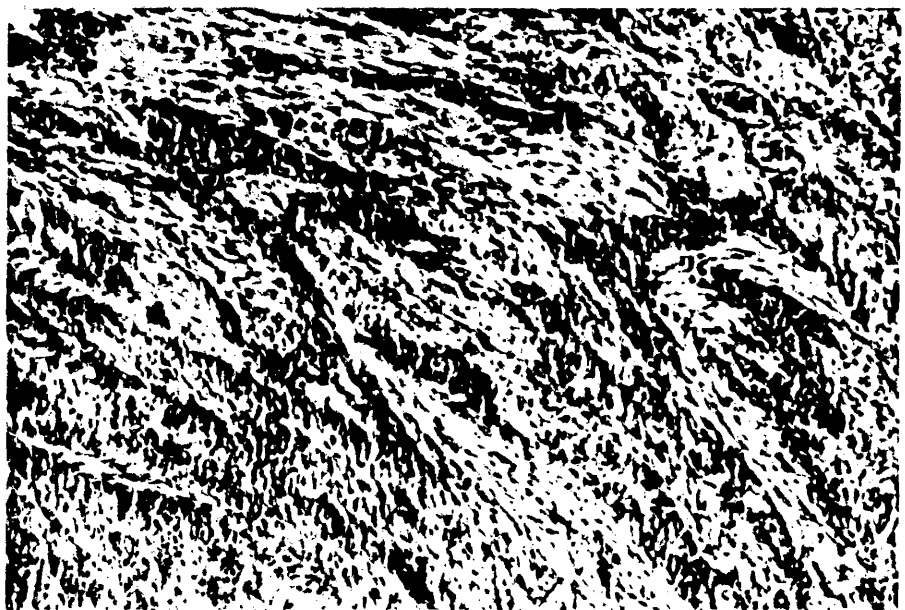


Fig. 39.- Mismo caso de la figura anterior. Celulas de pequeño tamaño con limites celulares mal definidos. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n° 35, H.E., apro. 350 x).

Fig. 40.- Zona de degeneración mixoide con presencia de areas opticamente vacias intersticiales originadas por acumulación de liquido. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°26, H.E., apro. 350 x).

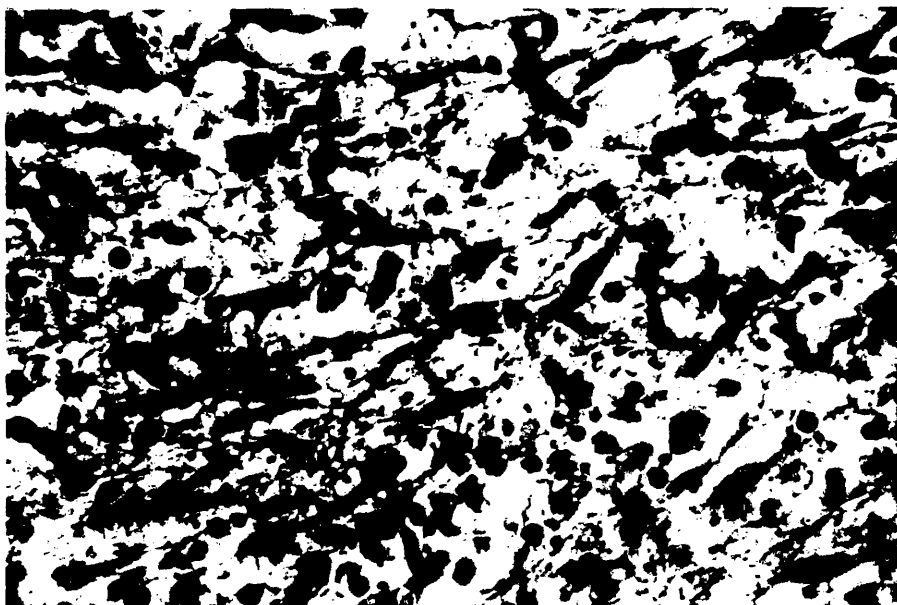
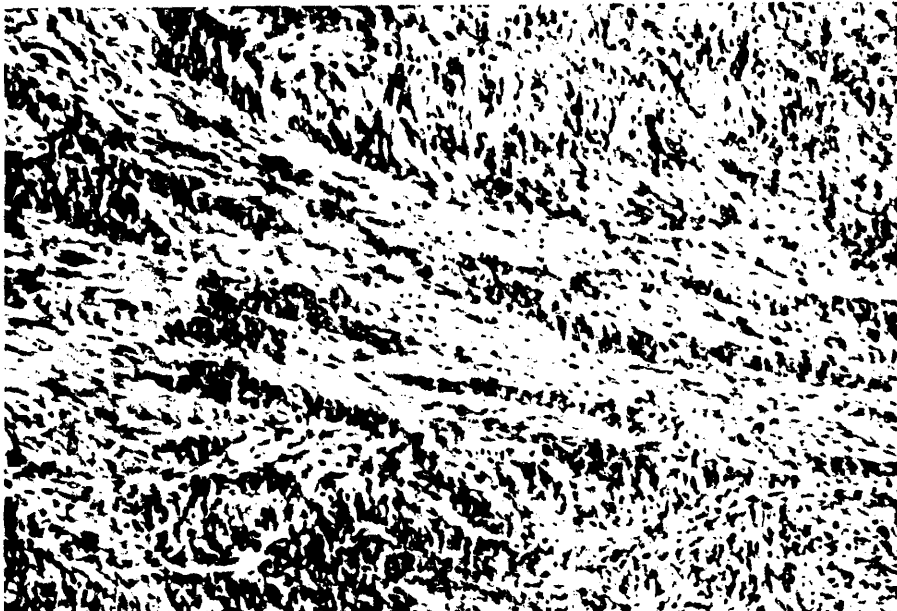


Fig. 41.- Ejemplo de Schwannoma maligno en el que se detectan disposiciones celulares tendentes a la configuracion de troncos nerviosos. (Serie AI n°3, H.E., apro. 100 x).

Fig. 42.- El mismo caso de la figura 41. Se observa a mayor aumento algunas formaciones con configuracion de troncos nerviosos seccionados transversalmente. (Schwannoma intraabdominal, serie AI n°3, H.E., apro. 350 x).

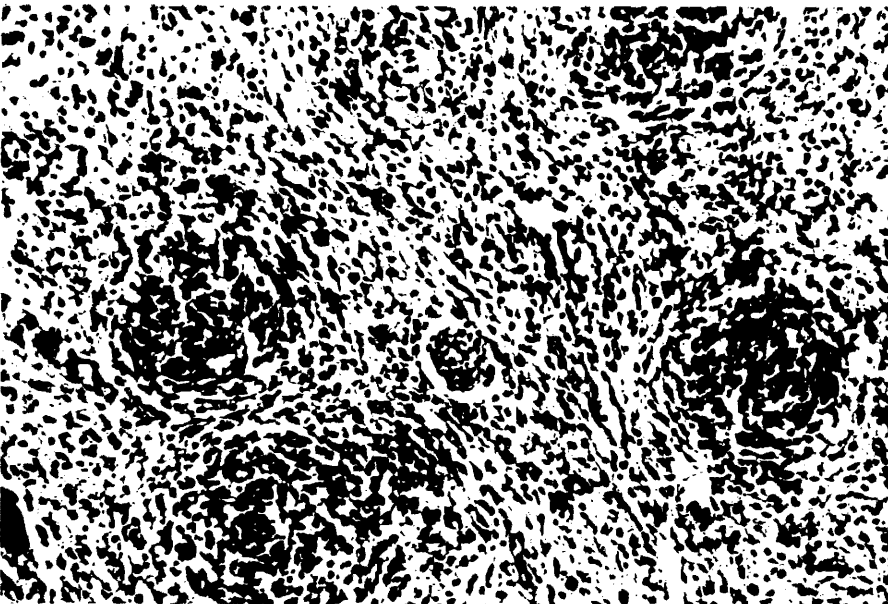
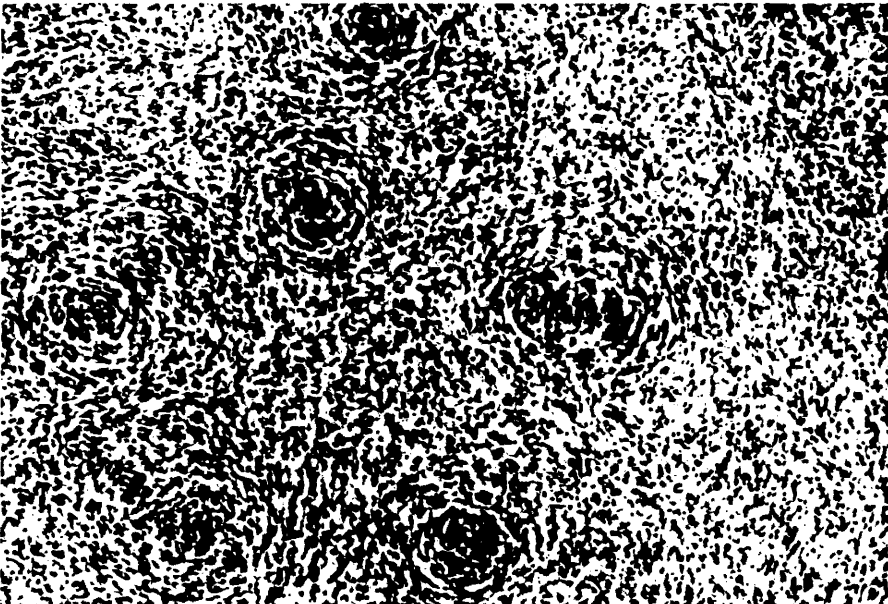


Fig. 43.- Varios troncos nerviosos en el seno de un neurofibrosarcoma plexiforme. (Serie AI n°18 H.E. apro. 100 x).

Fig. 44.- Detalle de dos formaciones tronculares nerviosas de gran tamaño. Mismo caso de la fig.43. (Shwannoma intraabdominal, serie AI n°18, H.E. apro. 350 x).

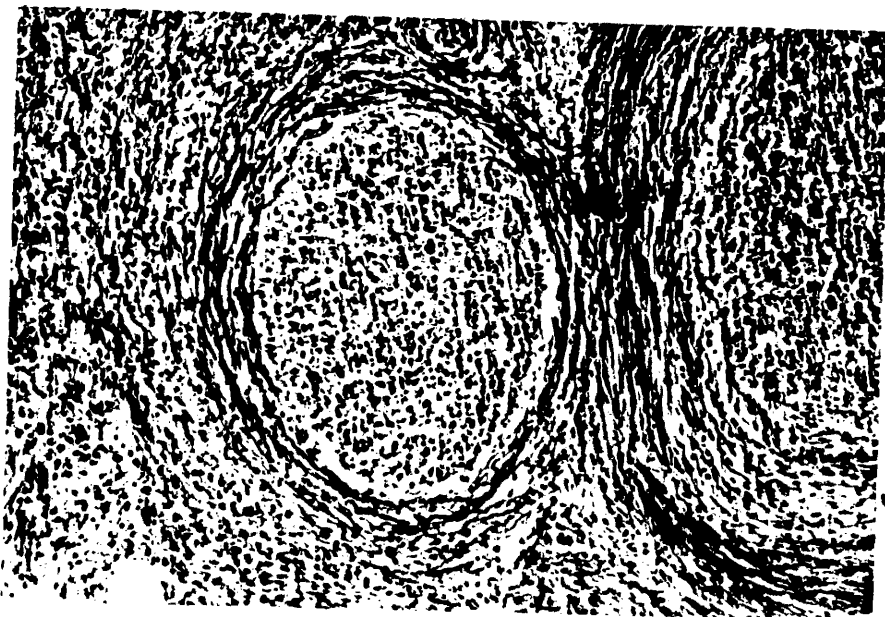


Fig. 45.- Oligodendroglioma de tamaño microscopico intrahemisferico que se descubrio en el estudio histologico. Este animal presentaba ademas un Schwannoma maligno intraabdominal de gran tamaño. (Serie AI n°11, H.E., apro. 100 x).

Fig.46.- Detalle de las celulas atipicas del oligodendroglioma periventricular desarrollado en el animal n°34, simultaneamente este animal presento ademas un Schwannoma maligno intraabdominal. (Serie AI n°34, H.E., apro. 350 x).

144

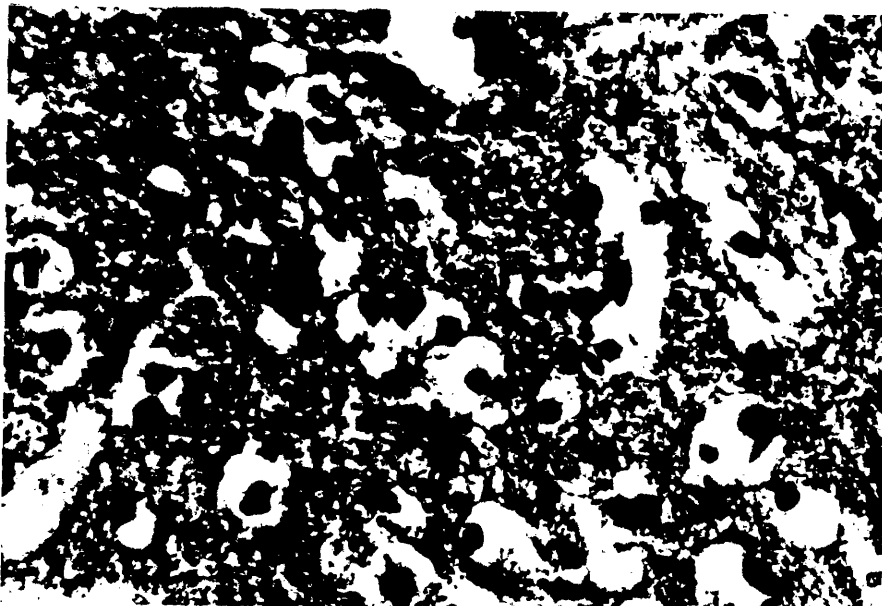
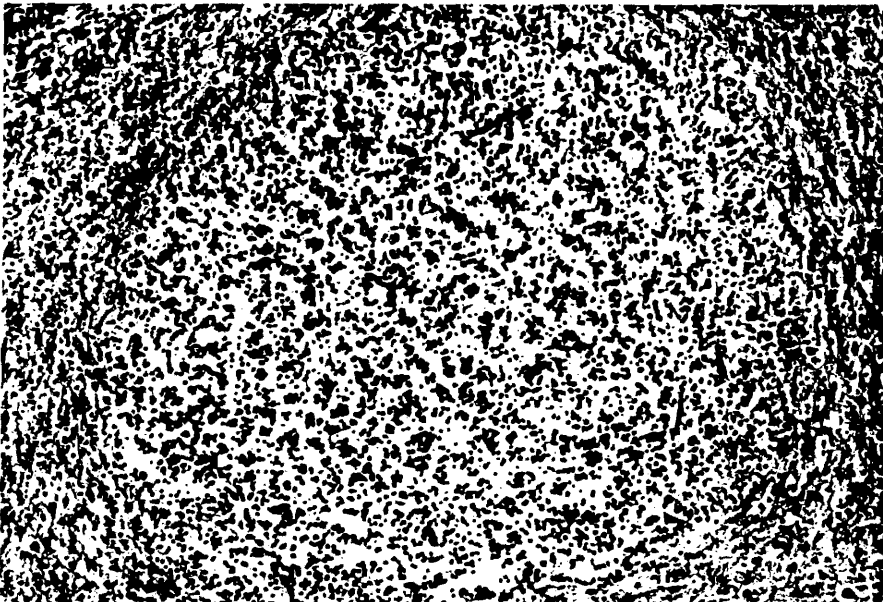


Fig. 47.- Mismo caso de la figura 45 en la que se observa a mayor aumento el oligodendroglioma intraemisférico desarrollado en el animal n°11. (Serie AI n°11, H.E. apro. 350 x).

Fig. 48.- Area limite de la periferia de un oligodendroglioma en la que se observa la falta de delimitación del encefalo normal por celulas neoplasicas. (Serie AI n°17, H.E. apro. 100 x).

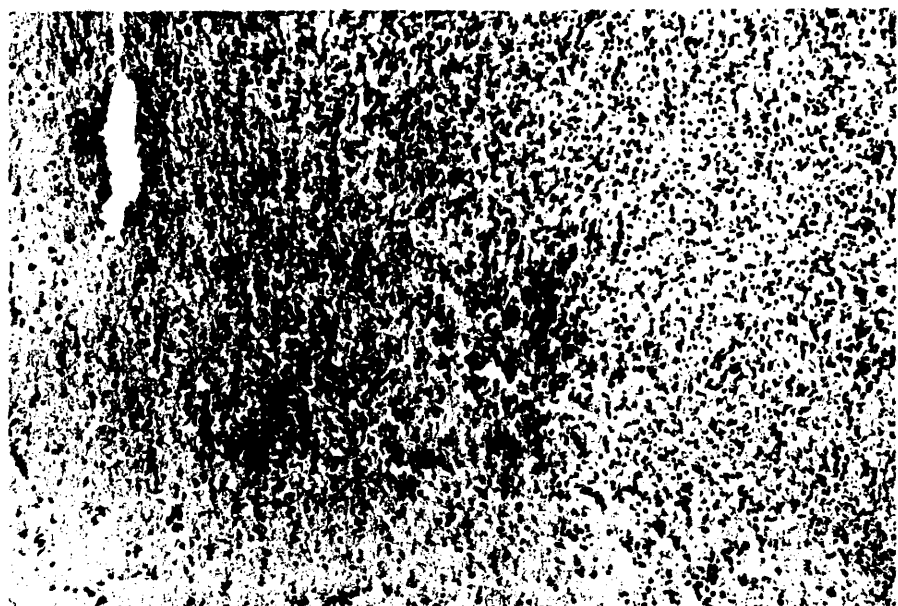
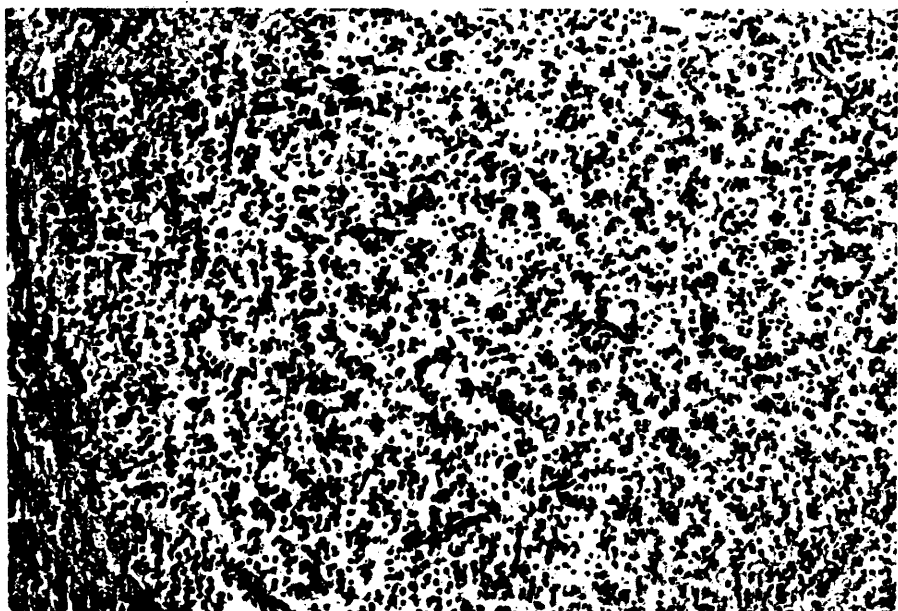


Fig. 49.- Oligodendroglioma encefalico que presenta citoplasmas con mayor densidad de la habitual, persistiendo sin embargo los característicos nucleos esferoideos rodeados por un halo claro citoplasmático. (Serie AI n°5, H.E. 100 x).

Fig. 50.- Típica imagen microscópica de oligodendroglioma en la que grupos celulares adoptan una disposición compacta. (Serie AI n°22, H.E. apro. 300 x).

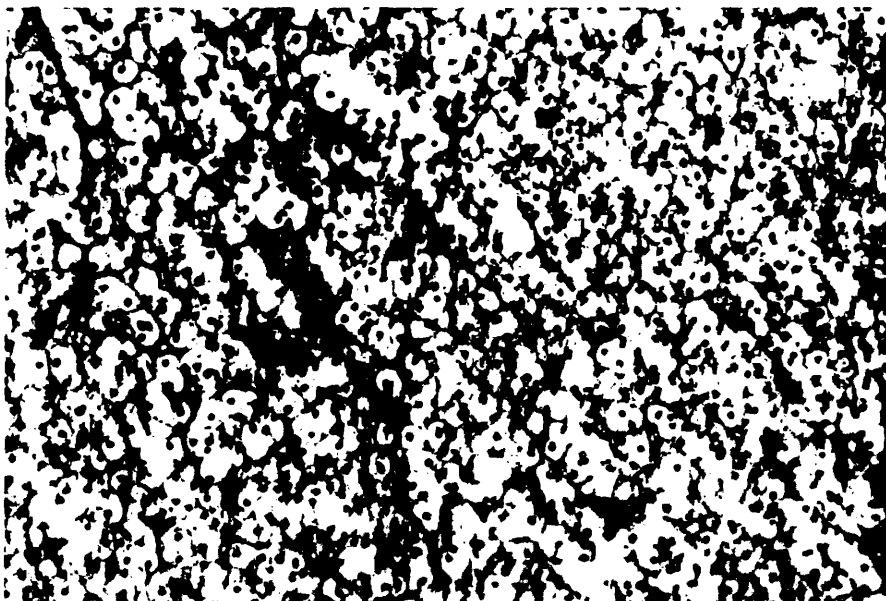
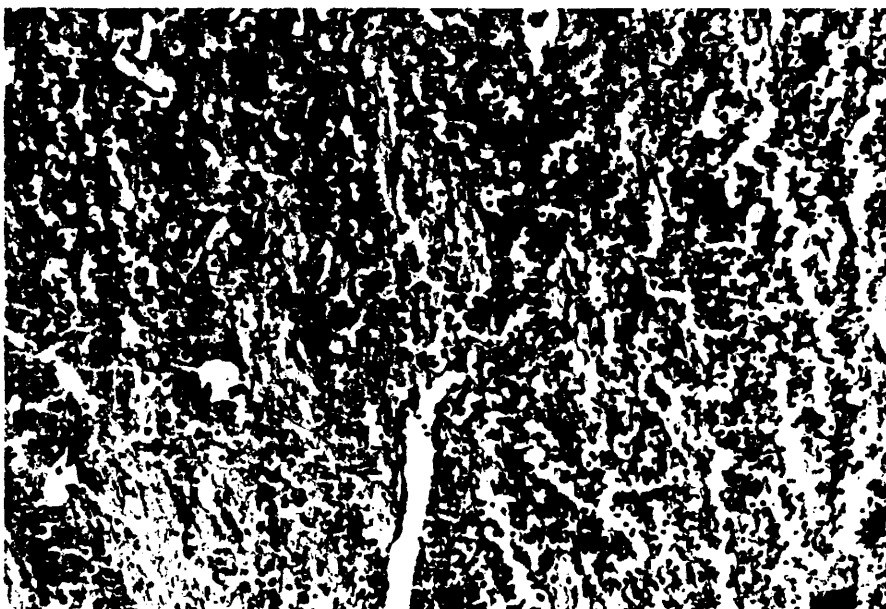
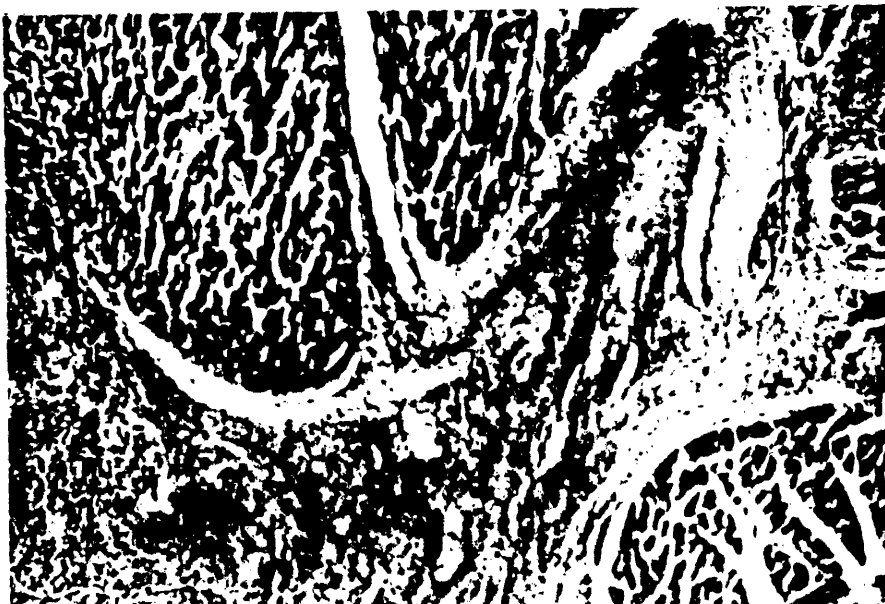
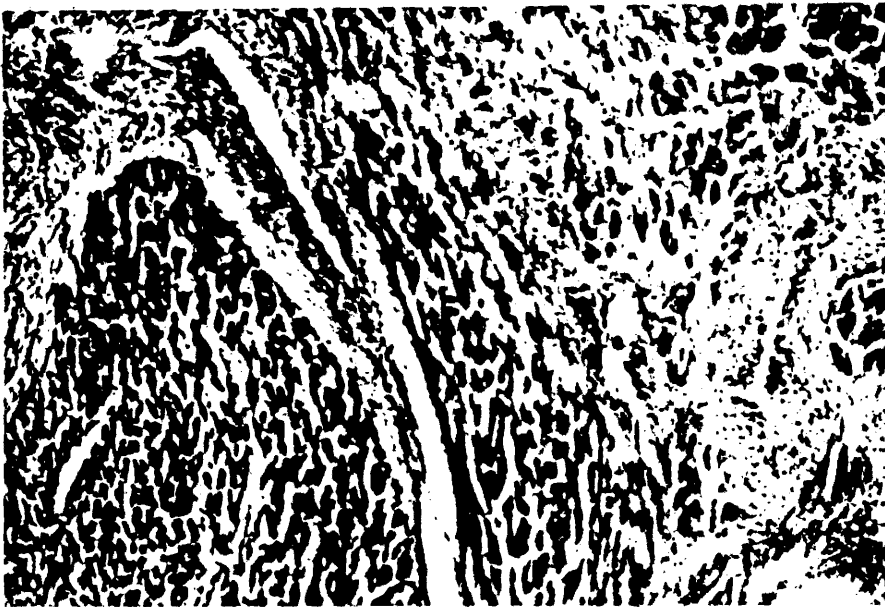


Fig. 51.- Infiltración intersticial de los haces musculares miocárdicos por un Schwannoma maligno.
(Serie AI nº9, H.E. apro. 100 x).

Fig. 52.- Mismo caso anterior en el que llama la atención la destrucción, por la invasión neoplásica de las fibras miocárdicas. (Schwannoma maligno serie AI nº9, H.E. apro. 100 x).



RESULTADOS DE LA SERIE A-II

Esta serie esta constituida por 39 ratas hembras, que fueron inyectadas con MNU a partir de la octava semana de vida cada 7 dias, durante 24 semanas y segun dosis y pautas señaladas en el apartado de material y metodos.

De los 39 animales referidos en esta serie, uno de ellos murio antes de la semana 24 del tratamiento, y su autopsia no revelo ningun tumor. Cinco animales fueron devorados ampliamente por los animales vivos de la misma jaula, y en sus restos no se identifico ningun crecimiento tumoral. Estos animales fueron desechados de los hallazgos, por lo que el numero efectivo considerado en esta serie es de 33.

El 72,8% de los casos presentaron tumor; la supervivencia de los mismos estaba comprendida entre 30 dias y 236 dias, siendo la supervivencia media de 126,6 dias.

Con el fin de exponer los resultados obtenidos de forma analoga a la serie anterior los hemos agrupado en los siguientes apartados:

I-a.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN LA CAVIDAD
ABDOMINAL

I.b.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN LA CAVIDAD
CRANEAL

I-c.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN SITIOS DISTIN-

TOS DE LA CAVIDAD ABDOMINAL Y CRANEAL.

I.d.- ANIMALES QUE DESARROLLARON DOS O MAS TIPOS TUMORALES DISTINTOS.

I-e.- ANIMALES QUE NO DESARROLLARON TUMOR.

I.a.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL

Hubo quince animales que desarrollaron tumor en el interior de la cavidad abdominal. (Números 40, 41, 44, 45, 48, 49, 51, 54, 56, 57, 58, 61, 62, 66, 71). La supervivencia de estos estuvo comprendida entre 40 días y 210 días, siendo la media de 139,3 días.

Todos los tumores desarrollados fueron diagnosticados de schwannomas malignos, de ellos nueve (casos 40, 41, 48, 54, 57, 58, 61, 62, 66) se localizaron en el hemiabdomen inferior en relacion con organos pelvicos (Fig. 53, 54) uno (nº 71) se manifestó con multiples formaciones nodulares de aproximadamente 1x1x1 cm., distribuidas por todo el peritoneo. Otros tres casos (Nº 44, 49, 56) estaban en la cavidad abdominal media, firmemente adheridos a la pared muscular anterior. Los otros dos casos se localizaron en las fosas renales, el mas pequeño de 3x2x2 cm. (caso 51) en el lado izquierdo y el otro de 6x6x4cm. en el lado derecho (caso 45).

Las características macroscópicas de estos tumores eran

similares. Su superficie externa era irregular y de coloración blanquecina, con áreas de necrosis y hemorragia. La mayoría de los tumores mostraban consistencia blanda y friable. Al corte frecuentemente presentaban un aspecto multiquístico con múltiples zonas de necrosis y hemorragia.

El estudio con el microscopio óptico demostró que todos los casos eran schwannomas malignos de alta densidad celular, constituidos por células de forma y tamaño variables, con frecuencia fusiformes, con citoplasma de límites mal definidos y núcleos hipercromáticos, dismórficos, con gran variabilidad de forma y tamaño y con algunas imágenes de mitosis atípicas. Estas células se disponen en haces entrecruzados. Con frecuencia existen abundantes formaciones quísticas, necrosis y zonas de hemorragia. (Fig. 56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67)

En tres casos (57,58,67) había zonas en las que las neoformaciones mostraban un patrón histológico abigarrado con células de gran tamaño de contorno poligonal (Fig 68,69). El citoplasma es eosinófilo y a menudo vacuolado; no se tiñe con el Sudan ni tampoco con la técnica de P.A.S.. Los núcleos son en número superior a 5, y, presentan polimorfismo, nucleolos manifiestos y a veces están en mitosis: Uno de los animales de este grupo (caso 57) desarrolló simultáneamente un adenocarcinoma de mama y otro un oligodendroglioma (caso 58). (Fig 78,83).

El estudio con microscopía electrónica mostro que las

celulas neoplasicas de los tumores que parecian corresponder a schwannomas poco diferenciados, presentaban caracteres propios de elementos schwannoides, identificandose con frecuencia en su matriz intercelularcolagena de periodo largo. Las celulas neoplasicas presentaban membrana basal aunque esta frecuentemente es discontinua. El citoplasma celular es poco denso con presencia ocasional de microfilamentos siendo caracteristico encontrar en el mismo la presencia de figuras mieloides y cuerpos lisosomales. (Fig 70,71,72,73,74a,74b,75).

En la Grafica VII se resumen los hallazgos de este grupo.

I-b.- ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN LA CAVIDAD CRANEAL

Hubo siete animales de esta serie que desarrollaron tumor en el interior de la cavidad craneal (casos 43,46,50,52,58,63 y 68). La supervivencia de estos animales estaba comprendida entre 52 dias y 222 dias, siendo la media de 150,5 dias.

Uno de ellos presento un tumor ovoideo intrahemisferico, en el lado derecho de 0,5cm. de diametro, de consistencia blanda y bien delimitado del resto del parenquima cerebral.(caso 68).

En tres casos (n50,52,63) se observo una zona de unos 0,3x0,2x0,2cm. de color rojizo amarillento, localizada en la superficie cerebral de los lobulos parietales (dos en el derecho y uno en el izquierdo).

Tres de estos casos (n43,46,58) no mostraban alteraciones

macroscopicas significativas en la superficie cerebral al extraer el encefalo.

El estudio histologico en los cuatro primeros casos, demostroque eran oligodendrogliomas. En todos ellos, los contornos estaban bien definidos del parenquima cerebral adyacente, el cual aparecia edematoso y en algunos casos congestivo. (Fig 78).

En los tres casos que no mostraban alteraciones macroscopicas significativas, el estudio histologico evidencio en la zona profunda de los hemisferios (dos en el derecho y uno en el izquierdo) Una area microscopica que correspondia a un crecimiento neoplasico constituido por celulas con características oligodendrogliales. (Fig 77,78). Ademas estos animales desarrollaron un segundo tumor; uno de ellos un epitelioma calcificante de Malherbe (n43), otro un carcinoma lobulillar infiltrante de mama (n46) (Fig 85,86), y el tercero un schwannoma maligno intraabdominal (n58) (Fig 53,69,70,71).

El resumen de los hallazgos de este grupo quedan reflejados en la grafica VIII.

I-c. ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN SITIO DISTINTO DE LA CAVIDAD ABDOMINAL Y CRANEAL.

Hubo seis animales que mostraron tumores en sitios distintos

de la cavidad abdominal y craneal (casos 43,46,47,57,70,72.). La supervivencia de estos estuvo comprendida entre 114 días y 236 días, siendo la media de 184,8 días.

Los tumores inducidos fueron: 3 carcinomas mamarios, 2 schwannomas malignos y 1 pilomatrixoma.

Los tres carcinomas mamarios estaban situados uno a nivel torácico: de 2,5x2x2 cm. (caso 46), otro abdominal de 2x2x2 cm. (caso 57) y el último en zona inguinal izquierda de 4x3x2cm (caso 70).

Dos tumores correspondían a schwannomas malignos, uno de ellos localizado entre los planos musculares del peto costal en su cara anterolateral izquierda. Medía 3x2x1cm (caso 72) y el otro schwannoma hallado estaba adherido al biceps femoris de la pata trasera izquierda. Tenía un tamaño de 4x3x3cm. (caso 47)

Un animal mostró una tumoración en el lado izquierdo del maxilar inferior de 4x2x2cm (caso 43) adherido a planos profundos que correspondía a un epiteloma calcificante de Malherbe.

Al estudio macroscópico de los casos diagnosticados de carcinoma mamario se mostraron como tumoraciones subcutáneas, que en el caso 70 ulceraba la piel, de consistencia firme, coloración blanquecina. Uno de ellos (nº 46) al estudio histológico mostraba un patrón lobulillar con grupos de acinos llenos de células tumorales, de citoplasma grande y claro, con núcleos

hipercromaticos y nucleolos prominentes. Estas celulas tumorales infiltraban el estroma adyacente, el cual es escaso y no presenta reaccion inflamatoria. (Fig 85,86).

Los otros dos casos correspondian a adenocarcinomas bien diferenciados de mama, que al estudio microscopico se mostraban como formaciones glanduloides de tamaño y formas variables, revestidos por una o varias hileras de celulas de contornos poliedricos citoplasma claro y nucleos dismorficos con imagenes de mitosis atipicas. (Fig 81,82,83,84). El estroma tumoral es escaso y en algunas zonas muestra una discreta reaccion linfoplasmocitaria. Uno de estos casos(n87) desarrollo un segundo tumor que fue un schwannoma maligno intraabdominal. (Fig. 68,73,74,75).

Los dos schwannomas malignos mostraban características macroscópicas similares. Presentaban una superficie externa blanquecina con áreas de necrosis y hemorragia de consistencia blanda. Al corte presentaban un aspecto esponjoso, multiquístico. Al estudio microscópico presentaban alta densidad celular constituidas por células de tamaño y formas variables, citoplasma eosinófilo límites mal definidos, que con frecuencia se disponen en haces entrecruzados. Los nucleos son hipercromaticos y dismorficos, con gran variabilidad de forma y tamaño e imágenes en mitosis atípicas. En ambos casos había invasión y destrucción del músculo y estructuras adyacentes. (Fig. 87 88).

El pilomatrixoma desarrollado, mostro en el estudio his-

tológico una gran cantidad de sales de calcio y células epiteliales tumorales que forman abundantes masas de queratina. Son frecuentes de visualizarlas "células en sombra". Este caso se acompaña simultáneamente de un oligodendroglioma. (Fig. 79 y 80).

Los hallazgos de este grupo quedan reflejados en la gráfica IX.

I-d. ANIMALES QUE DESARROLLARON DOS O MAS TUMORES DISTINTOS

Fueron cuatro los animales en los que se presentaron dos tipos de tumor (casos 43,46,57,58)! La supervivencia de los mismos estaba comprendida entre 114 días y 222 días, siendo la media de 179 días.

El estudio histológico evidencia que se trataba de:

Un oligodendroglioma con un epiteloma calcificante de Malherbe (caso 43) (fig. 79,80).

Un oligodendroglioma con un carcinoma lobulillar de mama (caso 46) Fig 77,85,86).

Un oligodendroglioma con un schwannoma maligno intrabdominal (caso 58) (Fig. 53,69,70,71).

Un schwannoma maligno intraabdominal con un adenocarcinoma de mama (caso 57) (Fig. 68,73,74,75).

Las características macroscópicas y microscópicas de estos tumores, han sido descritas en los apartados anteriores y quedan reflejados en la grafica X

I-e.- ANIMALES QUE NO DESARROLLARON TUMOR

Hubo nueve de los animales de esta serie que no presentaron tumores (casos 42,53,55,59,60,64,67,69,65). La supervivencia de los animales de este grupo estaba comprendida entre 30 días y 172 días, siendo la media de 71,3 días.

Cuatro de estos animales resultaron parcialmente devorados. Otros cinco presentaron una bronconeumonía maxiva.

Los hallazgos de este grupo quedan reflejados en la grafica XI.

ESTUDIO ESTADISTICO

Los resultados obtenidos al igual que en la serie AI fueron procesados en una computadora IBM 4341 utilizandose un lenguaje de programación FORTRAN-IV nivel F. Realizandose calculo de porcentajes, determinación de las medias aritmeticas, desviación típica y calculo de las probabilidades de las diferencias de medias entre los grupos en que se dividió esta serie según sus hallazgos.. Los resultados obtenidos son expuestos en la grafica XII.

GRAFICA - VII

ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS *	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROSC. CAV. ABDOMINAL	CARAC. MICROSC. NO ABDOMINALES
40	128	225	390	Tum. abd. inferior de 5x4x4 cm. que engloba órganos pélvicos. Metastasis pulmonar.	Schwannoma maligno	
41	206	225	360	Tum. abd. inferior que engloba órganos pélvicos. Mide 7x6x5 cm.	Schwannoma maligno	
44	175	225	270	Tum. abd. de 6x5x5 cm. unido a pared anterior de aspecto multiquístico.	Schwannoma maligno.	
45	40	235	260	Tum. abd. a nivel de fosa renal dcha. mide 6x6x4 cm.	Schwannoma maligno.	
48	203	230	340	Tum. abd. inferior de 3x2x2 cm.; consistencia blanda con amplias áreas de necrosis.	Schwannoma maligno.	
49	90	230	245	Tum. abd. 6x5x4 cm. de consistencia firme adherido a pared muscular anterior.	Schwannoma maligno.	

* La supervivencia se considera con arreglo a la fecha de la última dosis de carcinógeno.

GRAFICA VII

ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL (Cont.1)

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS *	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROSC. CAV. ABDOMINAL	CARAC. MICROSC. NO ABDOMINALES
51	154	130	160	Tum.abd. de 3x2x2 cm. de aspecto multiquístico a nivel renal izdo.	Schwannoma maligno	
54	167	190	200	Tum.abd. de 4x4x3 cm. en relación con órganos pélvicos.	Schwannoma maligno	
56	126	190	210	Tum.abd. de 3x2x1 cm. de aspecto multiquístico.	Schwannoma maligno	
57	210	160	330	Tum.abd. de 5x4x2 cm. en relación con órganos pélvicos.	Schwannoma maligno	Adenocarcinoma mamario
58	170	160	200	Tum.abd.inferior de 4x 3x3 cm.de aspecto mul- tiquístico.	Schwannoma maligno	Oligodendro- glioma
61	96	160	340	Tum.abd.inferior de 4x 3x1 cm. consistencia dura.	Schwannoma maligno	
62	128	160	360	Tum.abd.inferior de 6x 4x4 cm.consistencia dura.	Schwannoma maligno	

* La supervivencia se considera con arreglo a la fecha de la última dosis de carcinógeno.

GRAFICA-VII

ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN CAVIDAD ABDOMINAL (Cont..2)

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS *	PESO GR. 8° SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROSC. CAV. ABDOMINAL	CARAC. MICROSC. NO ABDOMINALES
66	130	155	210	Tum.abd. inferior de 4x2x2 cm. con múlti- ples zonas de necrosis.	Schwannoma maligno	
71	67	145	390	Múltiples formaciones nodulares en peritoneo de diámetro inferior a 1'5 cm.	Schwannoma maligno	

* La supervivencia se considera con arreglo a la fecha de la última dosis de carcinógeno.

GRAFICA -VIII
ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN CAVIDAD CRANEAL

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8° SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROSC. CAV. CRANEAL	CARAC. MICROSC. NO CRANEALES
43	114	225	200	No hallazgos significativos en cerebro.	Oligodendro- glioma	Epitelioma calcificante de Malherbe
46	222	235	320	Sin hallazgos macroscopicos en cerebro.	Oligodendro- glioma	Carcinoma lobulillar infiltrante.
50	150	230	260	Zona hemorrágica de 0'3x0'2x0'2 cm. en hemisferio dcho.	Oligodendro- glioma	
52	210	230	320	Zona de hemorragia en hemisferio izdo. de 0'3x0'4x0'2 cm.	Oligodendro- glioma.	
58	170	160	200	S.H. macroscopicos significativos.	Oligodendro- glioma.	Schwannoma maligno.
63	136	160	250	Pequeña zona de hemorragia en hemisferio derecho.	Oligodendro- glioma	
68	52	155	210	Tumor intrahemisférico de 0'5 cm. de Ø.	Oligodendro- glioma	

GRAFICA-IX
ANIMALES QUE DESARROLLARON TUMOR EN SITIO DISTINTO DE CAVIDAD ABDOMINAL

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8° SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERES MACROSCOPICOS OBSERVADOS	CARAC. MICROS.	CARAC. MICROSC. EN CAV. CRANEAL O ABD.
43	114	225	200	Tum. maxilar inferior de 3x2x2 cm. adherido a planos profundos.	Epitelioma calcificante de Malherbe	Oligodendroglioma
46	222	235	320	Formación nodular subcutanea a nivel torácico de 2'5x2x2 cm. de color blanquecino.	Carcinoma lobulillar infiltrante	Oligodendroglioma
47	150	235	110	Tumor en muslo dcho. de 4x3x3 cm.	Schwannoma maligno.	
57	210	160	330	Formación nodular subcutanea de 2 cm. de Ø en pared abdominal.	Adenocarcinoma de mama	Schwannoma maligno intraabdominal.
70	236	155	150	Tum. en pata trasera izda. de 4x3x2 cm.	Adenocarcinoma de mama	
72	177	145	340	Tum. en pared torácica izda. de 3x2x1'5 cm	Schwannoma maligno.	

GRAFICA-X

ANIMALES QUE DESARROLLARON DOS O MAS TIPOS TUMORALES HISTOLOGICAMENTE DISTINTOS

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE LOS TUMORES
43	114	225	200	Epitelioma calcificante de Malherbe con oligodendroglioma
46	222	235	320	Carcinoma lobulillar infiltrante con oligodendroglioma
57	210	160	330	Schwannoma maligno intraabdominal con adenocarcinoma de mama
58	170	160	200	Oligodendroglioma con schwannoma maligno intraabdominal.

GRAFICA .XI
ANIMALES QUE NO DESARROLLARON TUMOR

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO GR. 8ª SEMANA DE VIDA	PESO GR. AL MORIR	HALLAZGOS DE AUTOPSIA
42	153	225	290	Bronconeumonía masiva
53	38	196	220	Bronconeumonía masiva bilateral]
55	30	190	240	Bronconeumonía masiva bilateral].
59	167	160	200	Bronconeumonía masiva bilateral].
60	52	160	190	Parcialmente devorada
64	50	155	240	Bronconeumonía masiva bilateral].
67	40	155	210	Parcialmente devorada
69	52	155	270	Parcialmente devorada
65	60	155	160	Parcialmente devorada

GRAFICA - XII

	Nº CASOS	\bar{X} GR. PESO 8 SEMANA	\bar{X} PESO FINAL DE VIDA	\bar{X} DIAS SUPERVIVENCIA	%
SERIE AII	33	$\bar{X} = 182,879 \pm 35,991$	$\bar{X} = 260,151 \pm 72,892$	$\bar{X} = 126,636 \pm 62,491$	
T. CAVIDAD ABDOMINAL	15	$\bar{X} = 188,000 \pm 37,119$	$\bar{X} = 284,333 \pm 77,985$	$\bar{X} = 139,333 \pm 51,142$	45'4%
T. CAVIDAD CRANEAL	7	$\bar{X} = 185,000 \pm 43,397$	$\bar{X} = 245,714 \pm 45,408$	$\bar{X} = 150,571 \pm 58,134$	21'2%
T. EN SITIO DISTINTO DE CAVIDAD CRANEAL Y ABDOMINAL.	6	$\bar{X} = 192,500 \pm 43,330$	$\bar{X} = 241,667 \pm 101,078$	$\bar{X} = 184,833 \pm 46,744$	18'1%
NO TUMOR	9	$\bar{X} = 171,667 \pm 24,749$	$\bar{X} = 244,444 \pm 53,177$	$\bar{X} = 71,333 \pm 51,179$	27'2%

- 167 -

El cálculo de probabilidades de las diferencias de medias intergrupo indica que hay diferencias significativas con respecto a la supervivencia de los animales en los grupos siguientes:

- Animales que no desarrollaron tumor en relación con animales que desarrollaron tumor en cavidad abdominal P 0'005
- Animales que no desarrollaron tumor en relación con animales que desarrollaron tumor en cavidad craneal P 0'005
- Animales que no desarrollaron tumor en relación con animales que desarrollaron tumor en lugar distinto de cavidad craneal y abdominal P 0'005.

168

Fig. 53.- Aspecto macroscopico de un Schwannoma maligno en un animal hembra localizado en cavidad pelviana que invade hemiabdomen inferior.
(Shwannoma intraabdominal, serie AII n°58).

170



Fig. 54.- Voluminosa neoplasia de hemiabdomen inferior que hace prominencia a nivel subcutaneo ulcerando la piel. (Schwannoma intraabdominal, serie AII n°41)

Fig. 55.- Aspecto macroscopico del caso n°71 en el que se observan la cavidad peritoneal invadida por múltiples nodulos neoplasicos de aproximadamente un centímetro de diametro. (Schwannoma intraabdominal, serie AII n°71).



Fig. 56.- Schwannoma maligno que muestra bandas entrelazadas de células fusiformes con moderado pleomorfismo. (Schwannoma intraabdominal, serie AII n°40, H.E. apor. 350 x).

Fig. 57.- Schwannoma maligno con característica disposición celular arremolinada. Las células presentan un aspecto fusiforme de núcleos alargados. (Schwannoma intraabdominal, serie AII n°48, H.E. apor. 350 x).



Fig. 58.- Aspecto morfologico macroscopico de una neoplasia abdominal de alta densidad celular con disposici6n fascicular y moderado pleomorfismo nuclear. (Schwannoma intraabdominal, serie AII n°49, H.E. apro. 350 x).

Fig. 59.- Aspecto microscopico de un Schwannoma maligno constituido por celulas de pequeno tamaño y limites celulares poco netas. La neoplasia presenta una conducta biologica maligna con invasi6n de estructuras adyacentes y condujo a la muerte del animal.(Schwannoma intraabdominal, serie AII n°51, H.E., apro. 350 x).

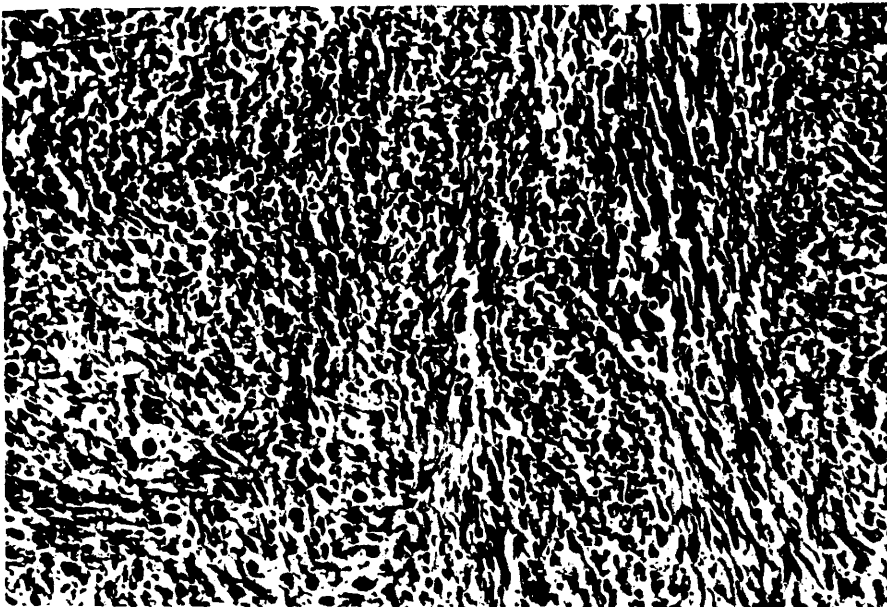


Fig. 60.- Disposición fasciculada característica de las células neoplásicas con arremolinamiento celular. Existe polimorfismo celular. (Schwannoma intraabdominal, serie AII n°56, H.E., apro. 350 x).

Fig. 61.- Campo microscópico a mayor aumento del mismo caso anterior. Se observa intenso polimorfismo nuclear. (Schwannoma intraabdominal, serie AII n°56, H.E. apor. 450 x).

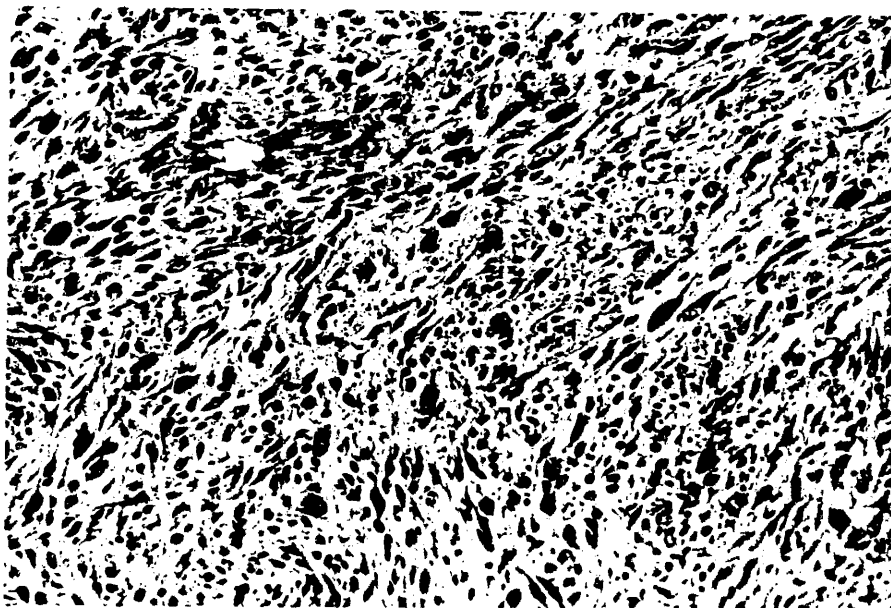
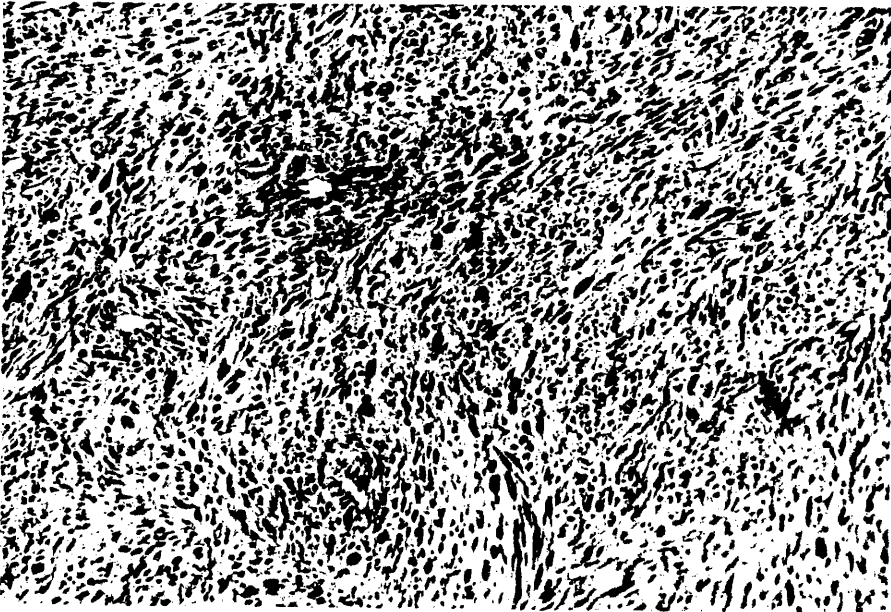


Fig. 62.- Seccion de Schwannoma maligno de elevada densidad celular. Las celulas presentan nucleos esferoideos hipercromaticos pleomorficos. En el angulo inferior izquierdo se inicia un pequeño quiste. (Serie AII n°61 , H.E., apro. 350 x).

Fig. 63.- Area con focos de degeneracion quistica conteniendose en alguna de ellas restos de liquido y proteinas anhistas. Campos con estas características son frecuentes en estos tumores. (Schwannoma intraabdominal, serie AII n°62, H. E. apro. 350 x).

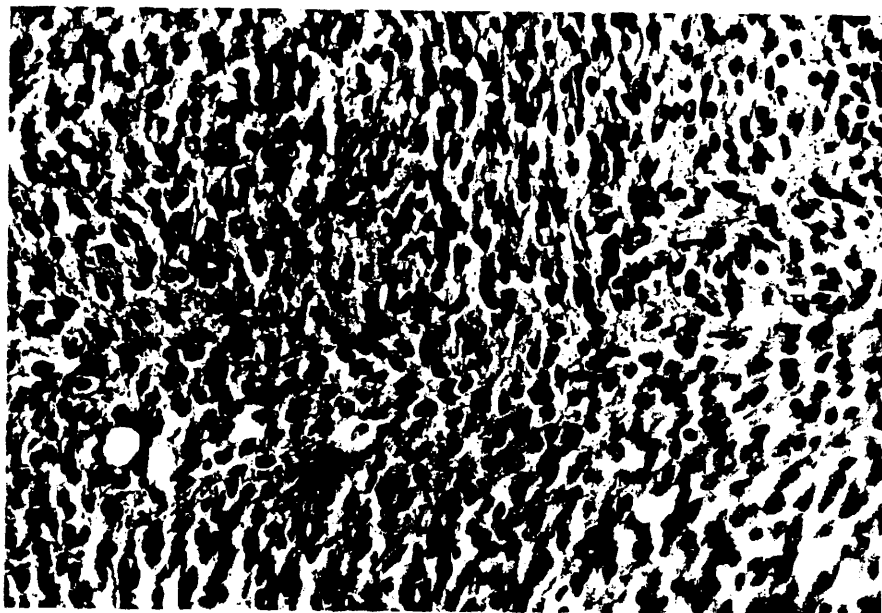


Fig. 64.- Schwannoma maligno de alta densidad celular.

Los contornos celulares estan mal definidos. La disposición celular tiende a la configuración de troncos nerviosos. (Serie AII n°45, H.E. apro. 350 x).

Fig. 65.- Tronco nervioso seccionado transversalmente

en el seno de un Schwannoma maligno. (Serie AII n°66, H.E. apro. 350 x).

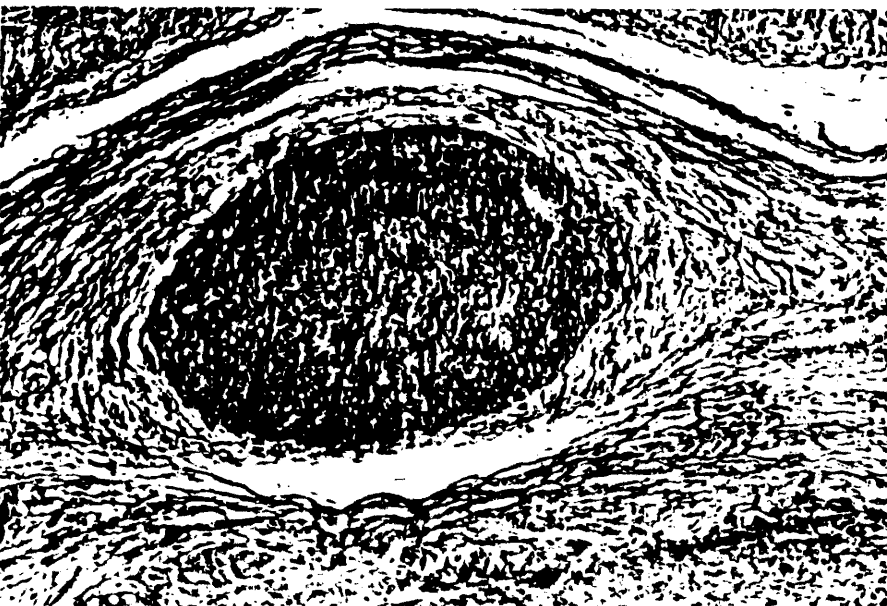
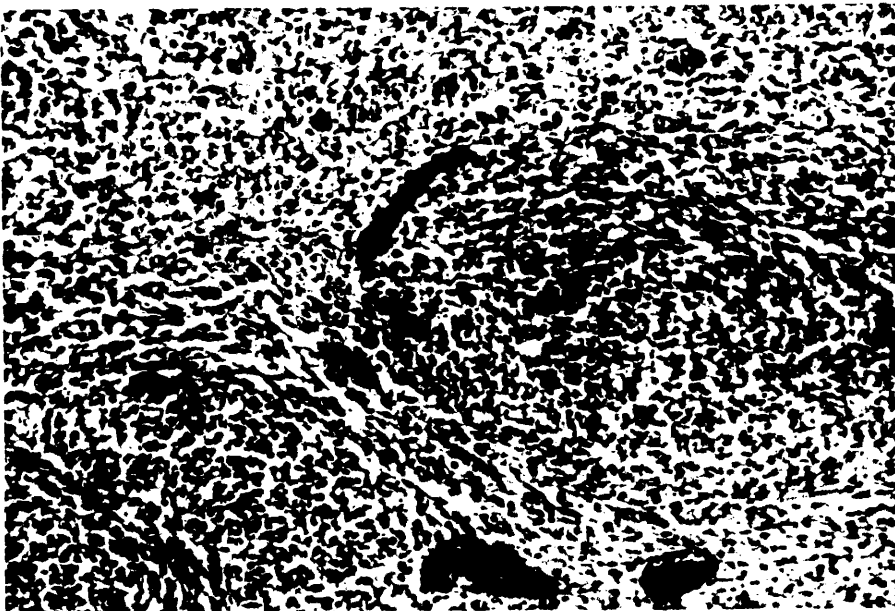


Fig. 66.- Mismo caso anterior . Se observan dos troncos nerviosos de gran tamaño en el seno de un Schwannoma maligno. (Serie AII n°66, H.E., apro. 350 x).

Fig. 67.- Troncos nerviosos de diverso tamaño seccionados transversalmente en el seno de un Schwannoma maligno plexiforme (Serie AII n°44, H.E., apro. 350 x).



Fig. 68.- Aspecto pleomorfico intenso en la trama de un Schwannoma maligno en el que el cuadro microscopico plantea dificultades de diagnostico diferencial con otra neoplasia de distinta estirpe. (Schwannoma maligno, serie AII n°57, H.E., apro. 350 x).

Fig. 69.- Caracteristica disposici3n ondulada de las células malignas nerviosas con morfología fusiforme elongada y nucleos polimorfos. En otras zonas el polimorfismo es más intenso (Schwannoma maligno , serie AII n°58, H.E. 350 x apro.).

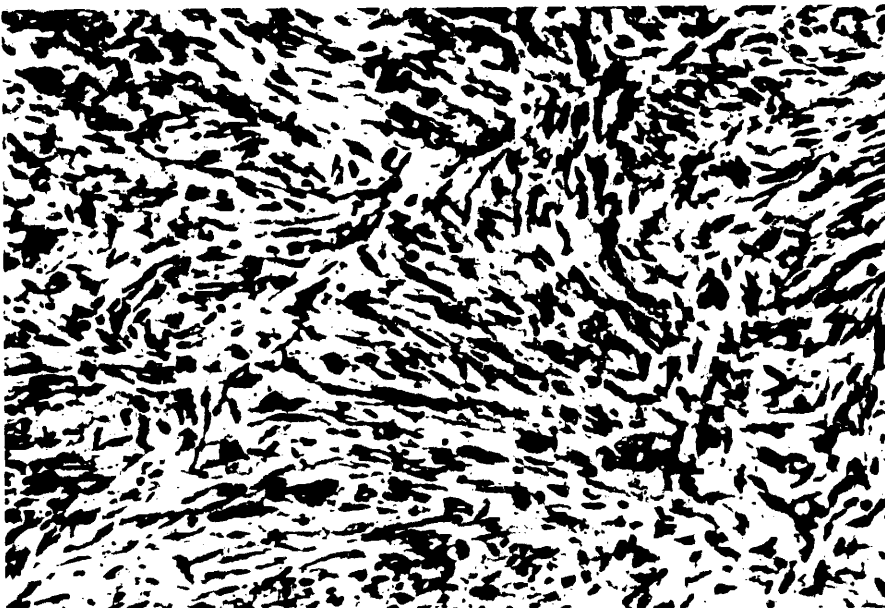
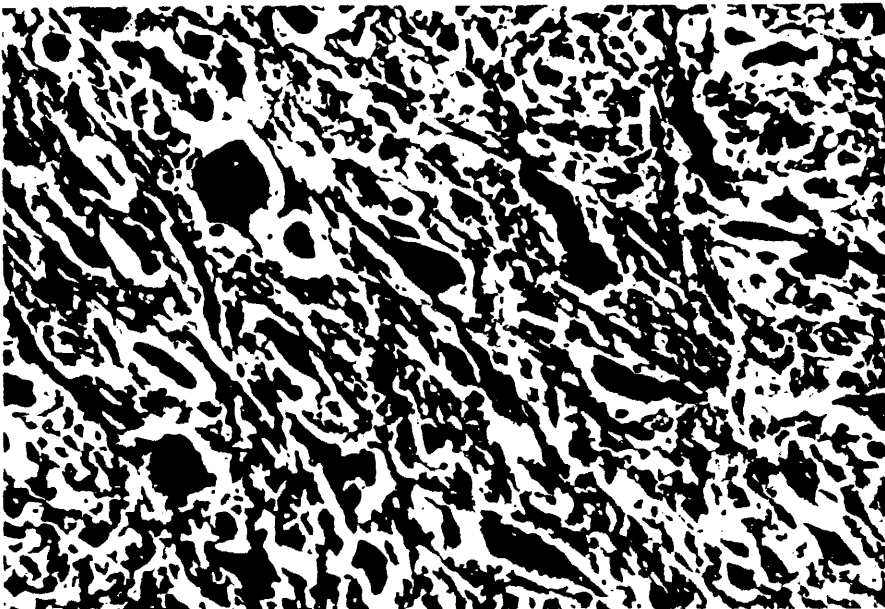




Fig. 7o.- Celula de Schwann neoplasica  , rodeada de membrana basal . El contorno de la envoltura nuclear es irregular. (Serie AII n°58, apro. 19.200 x).



Fig. 71.- Elementos neoplasicos poco diferenciados, con ocasional presencia de zonas de union inter - celulares de tipo desmosomico →. ★ nucleo celular. (Serie AII n°58, 14.400 x).

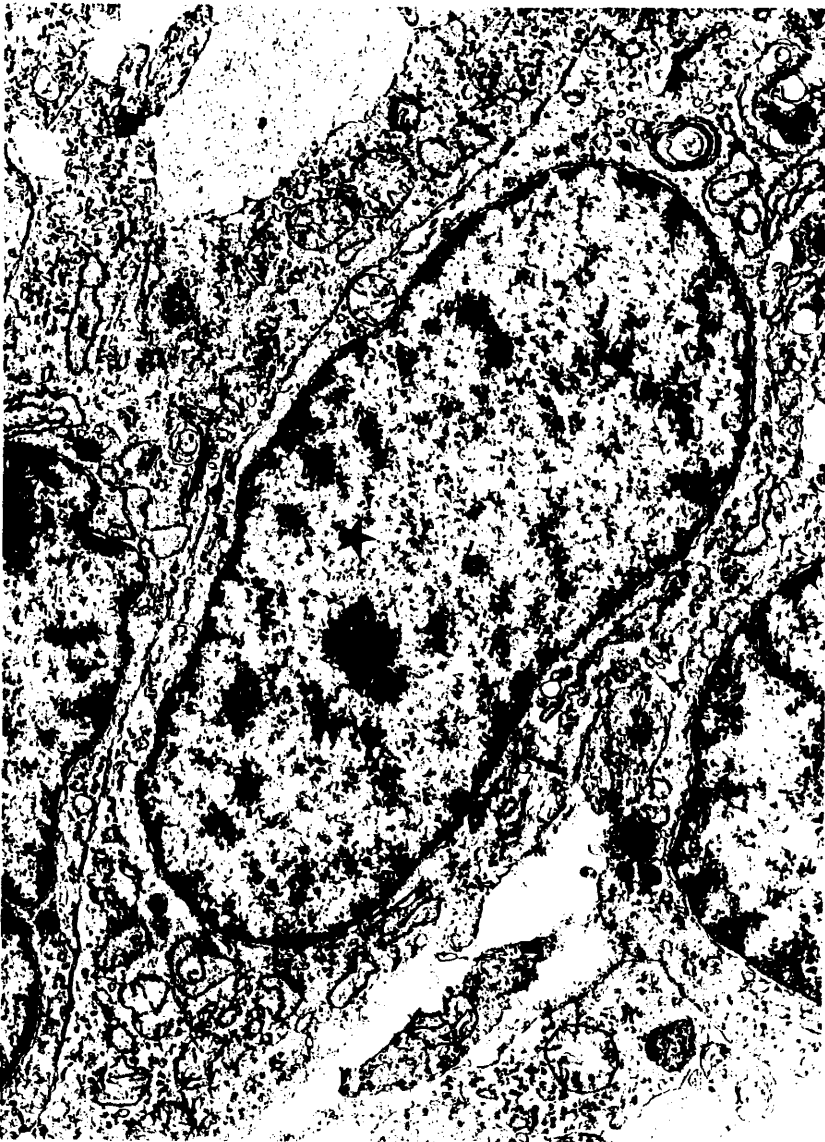


Fig. 72.- Elementos neoplasicos cuyo nucleo presenta grandes irregularidades en su cubierta. La célula aparece revestida incompletamente por membrana basal ➡. El espacio interceluar * es finamente fibrilar *. (Schwannoma maligno, serie AII n°67, apro. 36.000 x).



Fig. 75.- Celulas con escasos signos de diferenciación y
 lámina fibrosa nuclear →. ▀ membrana
 basal discontinua. (Schwannoma maligno, serie
 AII n°57, apro. 28.000 x).



Fig. 74.- a y b: Presencia en el espacio extracelular ➡
de acumulos de colagena fibrosa de espacio lar-
go. (Schwannoma maligno , serie AII n°57, apro.
108.000 x). (apro. 60.000 x).

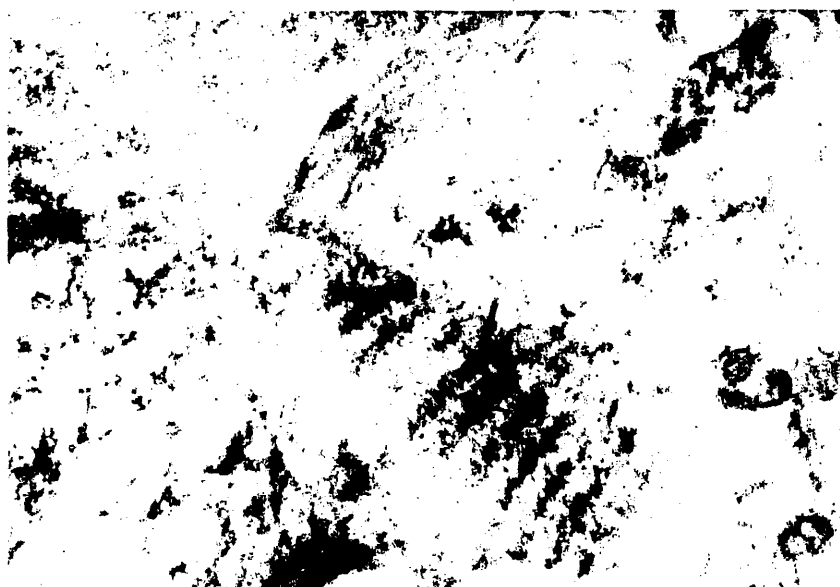



Fig. 75.- Zona de la neoplasia rica en colagena nativa. 
(Schwannoma maligno, serie AII n°57, apro.
12.000 x).



Fig. 76.- Oligodendroglioma de alta densidad celular, ricamente vascularizado, que en zonas adyacentes mostraba areas de hemorragia. (Serie AII n°68, H.E., apro. 350 x).

200



Fig. 77.- Moderado edema de la sustancia blanca cerebral en las zonas adyacentes a un oligodendroglioma observable en el angulo superior derecho de la imagen. (Serie AII n°46, H.E. apro. 350 x).

Fig. 78.- Oligodendroglioma en proximidad de plexos coroides , presente en el animal 58 en el cual se indujo tambien un Schwannoma maligno intraabdominal. (Serie AII n°58, H.E. apro. 350 x).



Fig. 79.- Epitelioma calcificado de Malherbe (pilomatrixoma), encontrado en el animal n°43 siendo patente existencia de celulas de tipo basal y celulas fantasma o sombra. (Serie AII n°43. H.E., apro 350 x).

Fig. 80.- Detalle correspondiente a las zonas regresivas conteniendo las llamadas celulas fantasma en el pilomatrixoma anterior. (Serie AII n°43, H.E., apro 350 x).

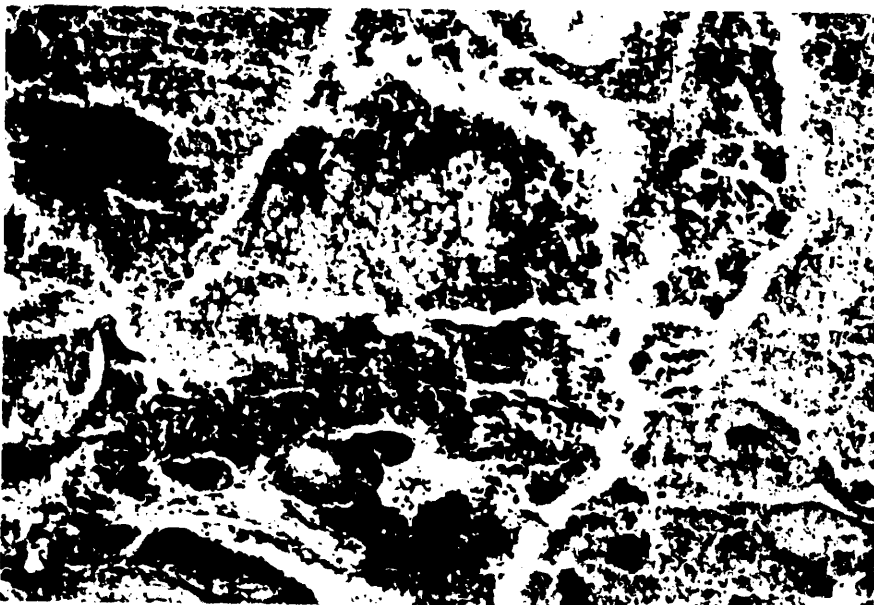


Fig. 81.- Adenocarcinoma mamario. Intenso pleomorfismo de las células que se disponen formando estructuras glandulares. Algunos elementos muestran células con la denominada morfología en anillo de sello. (Serie AII n°70, H.E. apro. 350 x).

Fig. 82.- Aspecto monomorfo observado en otras áreas del adenocarcinoma presentado en la fig. 81. (Serie AII n°70, H.E. apro. 350 x).

206

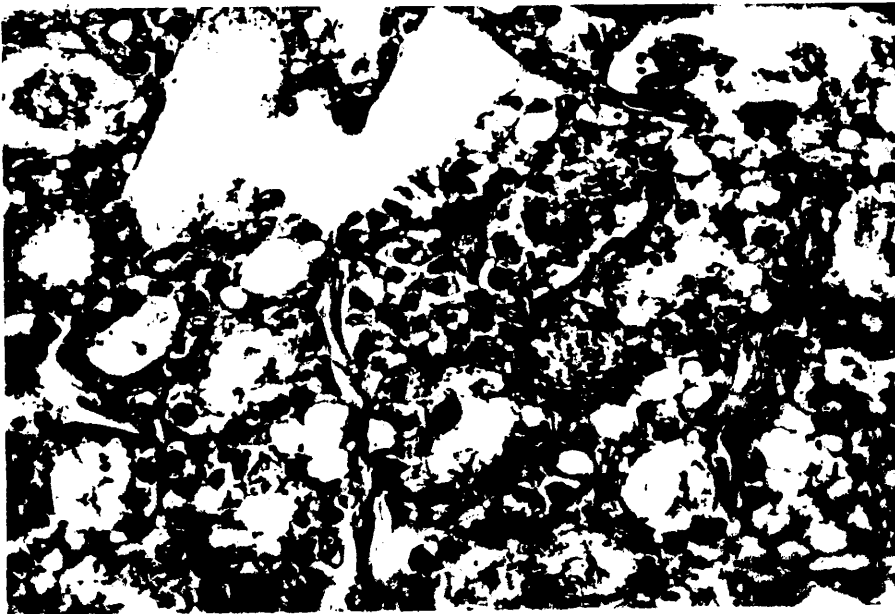


Fig. 83.- Adenocarcinoma mamario en el que se observan formaciones glanduloides al lado de otras de mayor tamaño quísticas. (Serie AII n°57, H.E. apro. 350 x).

Fig. 84.- Aspecto monomorfo similar al de la figura 82.
(Adenocarcinoma mamario, serie AII n°70, H.E., apro. 350 x).

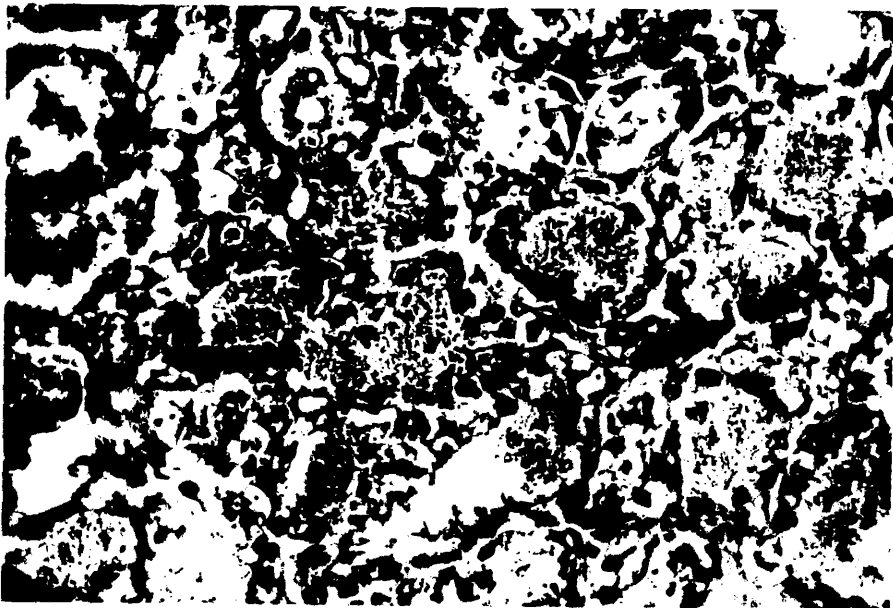
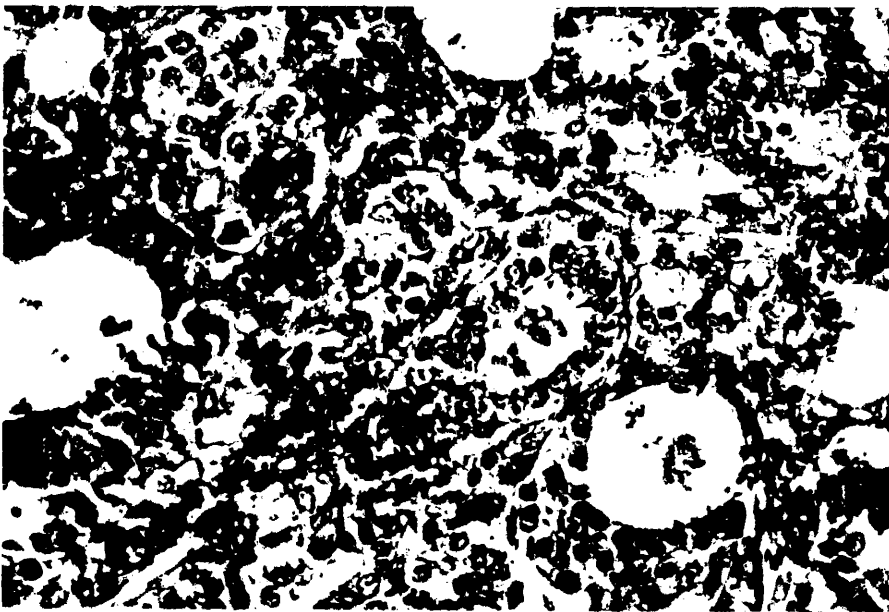


Fig. 85.- Adenocarcinoma mamario con intensas dilataciones quísticas y material proteico en su interior.
(Serie AII n°46, H.E. apor. 100 x).

Fig. 86.- Adenocarcinoma mamario en el que se ve formaciones glandulares al lado de otras de mayor tamaño. (Serie AII n°46, H.E., apro. 350 x).

210

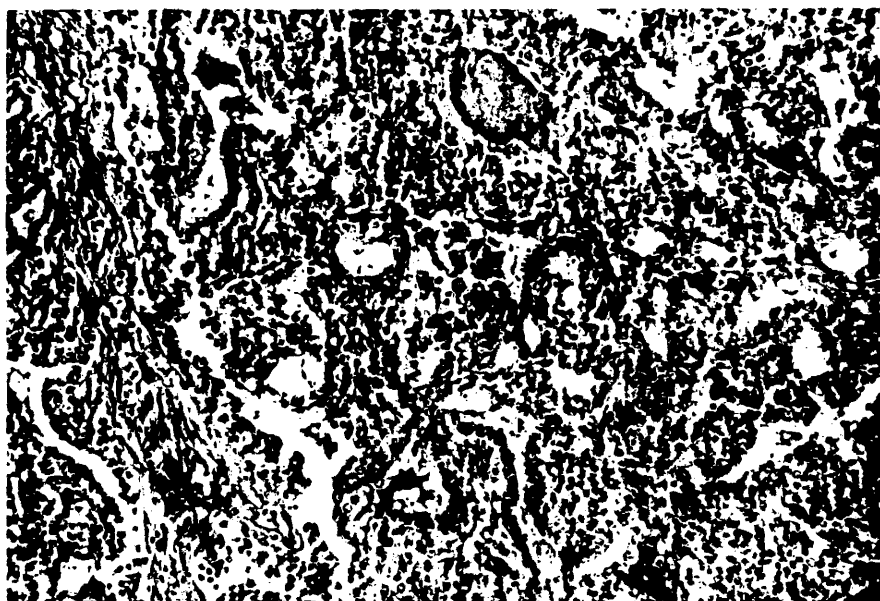
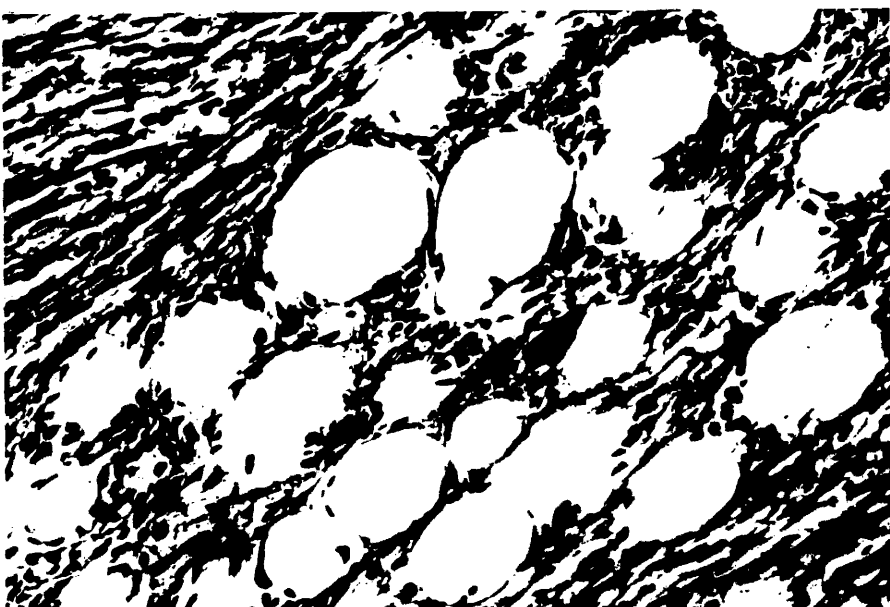
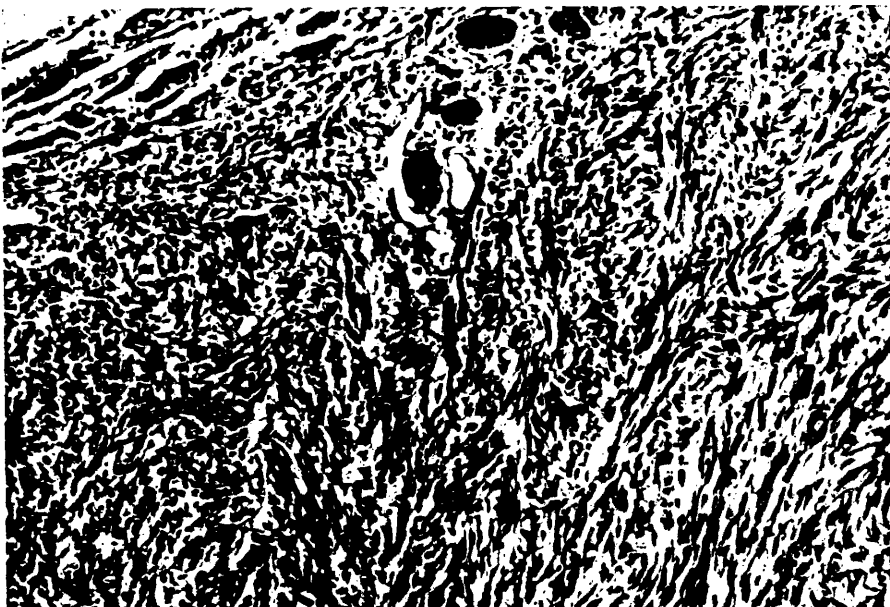


Fig. 87.- Detalle del Schwannoma maligno en el que se observa la capacidad de crecimiento invasivo sobre musculo de pared costal. (Serie AII n°72, H.E. apro. 350 x).

Fig. 88.- Zona microscópica de un Schwannoma maligno en el que las celulas neoplasicas crecen infiltrando el tejido adiposo, simulando una imagen de degeneración quística. (Serie AII n°47, H.E. apro. 350 x).



RESULTADOS DE LA SERIE B-I

Esta serie está constituida por 46 ratas macho que fueron utilizadas como control. Los animales de esta serie fueron mantenidos en las mismas condiciones alimenticias y ambientales que los de la serie A-I, siendo manipulados en el laboratorio de igual forma, exceptuándose la administración del carcinógeno que en este caso no se realizó. El peso de estas ratas al comenzar el experimento, es decir, a las ocho semanas de vida estaba comprendido entre 190 gr. y 210 gr. De forma análoga a la serie A, dispusimos esperar a la muerte espontánea de los animales, sin embargo por razones de necesidad del laboratorio decidimos el sacrificio de los animales de este grupo a los 20 meses de edad. Esta supervivencia fue en todos los casos superior a la que presentaron los animales de la serie A, ya que en esta serie el animal que vivió más tiempo alcanzó la edad de 15 meses y 5 días, como ya hemos referido.

Ninguno de los animales de esta serie desarrolló tumor y las autopsias realizadas a los mismos, no reveló hallazgos macroscópicos significativos.

Los hallazgos de esta serie quedan reflejados en la gráfica XIII.

Todos los animales de esta serie vivieron 20 meses. En la columna de la supervivencia se reflejan la edad alcanzada

-213-

por los animales a la que previamente se le han restado 32 semanas de vida, ya que la supervivencia de la serie inyectada se considera a partir de la última dosis de carcinógeno.

GRAFICA XIII

RESULTADOS DE LA SERIE B-I (MACHOS)

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO 8ª SEMANA DE VIDA	PESO AL MORIR	HALLAZGOS DE AUTOPSIA
1	376 "	190	550	Sin hallazgos
2	376	190	530 III	Sin hallazgos
3	376	190	450	Sin hallazgos
4	376	190	570	Sin hallazgos
5	376	190	560	Sin hallazgos
6	376	190	560	Sin hallazgos
7	376	190	575	Sin hallazgos
8	376	210	520	Sin hallazgos
9	376	210	510	Sin hallazgos
10	376	210	520	Sin hallazgos
11	376	210	510	Sin hallazgos
12	376	210	480	Sin hallazgos
13	376	210	660	Sin hallazgos
14	376	210	505	Sin hallazgos
15	376	210	520	Sin hallazgos
16	376	210	510	Sin hallazgos
17	376	210	450	Sin hallazgos
18	376	210	490	Sin hallazgos
19	376	210	500	Sin hallazgos
20	376	210	470	Sin hallazgos
21	376	210	440	Sin hallazgos
22	376	210	505	Sin hallazgos
23	376	210	480	Sin hallazgos
24	376	210	450	Sin hallazgos

GRAFICA XIII

RESULTADOS DE LA SERIE B -I (MACHOS) (Cont. 1)

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO 8ª SEMANA DE VIDA	PESO AL MORIR	HALLAZGOS DE AUTOPSIA
25	376	210	540	Sin hallazgos
26	376	210	590	Sin hallazgos
27	376	210	510	Sin hallazgos
28	376	190	520	Sin hallazgos
29	376	190	400	Sin hallazgos
30	376	190	550	Sin hallazgos
31	376	190	500	Sin hallazgos
32	376	210	370	Sin hallazgos
33	376	210	480	Sin hallazgos
34	376	190	520	Sin hallazgos
35	376	190	510	Sin hallazgos
36	376	190	450	Sin hallazgos
37	376	190	540	Sin hallazgos
38	376	190	420	Sin hallazgos
39	376	190	460	Sin hallazgos
40	376	190	400	Sin hallazgos
41	376	190	470	Sin hallazgos
42	376	190	480	Sin hallazgos
43	376	190	460	Sin hallazgos
44	376	190	450	Sin hallazgos
45	376	190	500	Sin hallazgos
46	376	190	550	Sin hallazgos

RESULTADOS DE LA SERIE B-II

Esta serie esta constituida por 50 ratas hembras, a las que no se inyectaron el carcinogeno y fueron utilizadas como control. Los animales de esta serie fueron mantenidos en las mismas condiciones alimenticias y ambientales que los de la serie A, siendo manipulados en el laboratorio de igual forma, exceptuandose la adminstracion del carcinogeno que en esta caso no se realizo. El peso de estas ratas al comenzar el experimento, es decir, a las ocho semanas de vida, estaba comprendido entre 190 y 210 grs.. Al igual que en la serie B-I y por los mismos motivos, decidimos el sacrificio de los animales de este grupo a los 20 meses de edad.

Al realizar la autopsia de estos animales, dos presentaron una neumonia bilateral abcesificada (cosos 21 y 39) (fig 91). un animal presento un absceso de aproximadamente 1cm. de diametro en el lobulo inferior del pulmon izquierdo (caso 20). sietede los animales de este grupo desarrollaron una masatumoral (casos 1, 2, 11, 26, 33, 45, 50). Tres de estas masas estaban situadas en la region pectoral derecha. La mas pequena de ellas (1) pesaba 210gr. y media 6x5x4cm.. La mayor (11) media 9x7x4cm. y pesaba 290 grs., la tercera pesaba 230 grs, y media 9x9x8cm (fig 89) . Dos de las tumoraciones se desarrollaron en la region pectoral izquierda, y median 10x8x7 cm.(50) y 2x2x2cm. (45). Las otras dos estaban situadas en la linea mamaria a nivel ab-

dominal. Estas ultimas eran de menor tamaño, midiendo 4x4x3 cm. (39) y 2x1x1cm. (65).

Todos estos tumores se encontraban situados subcutaneamente, no adheridos a planos musculares. Al estudio macroscopico se mostraban como masas bien delimitadas, de coloracion blanquecina y consistencia firma. (Fig. 90). Al corte muestran una coloracion sonrosada y un aspecto fascicular.

Al estudio con microscopio optico, tres casos (11,26,50) fueron diagnosticados de fibroadenoma de mama y mostraban características superponibles: se mantiene una estructura lobulillar, con abundante estroma fibroso a veces colagenizado, que comprime el componente glandular. Las glandulas muestran variacion de forma y tamaño, la mayoría son ovoideas, revestidas por una o mas hileras de celulas, de contornos regulares y nucleos densos. La membrana basal de estas glandulas esta bien definida, a veces el crecimiento del estroma comprime las luces glandulares que aparecen colapsadas. Existen con frecuencia dilataciones quísticas glandulares que en algunos casos muestran un material basofilo en su luz. (Fig. 92 y 93).

Los casos restantes (1,12,33,45) correspondian a displasias mamarias y al estudio histologico se mostraban como proliferacion del parenquima epitelial con formacion de glandulas revestidas por una o mas hileras de celulas. Dichas glandulas se encuentran intimamente adosadas entre si. Es frecuente observar dilataciones glandulares. (fig 94 y 95)

Los hallazgos de esta serie quedan reflejados en la grafica XIV .

ESTUDIOS ESTADISTICOS

En la serie B se hicieron los mismos estudios estadisticos que en la serie A, realizandose calculo de porcentajes, determinacion de medias aritmeticas, desviacion tipica y calculo de probabilidades de la diferencia entre los hallazgos obtenidos en la serie A con respecto a los hallazgos de la serie B.

Los resultados obtenidos son expuestos en la grafica XV.

GRAFICA XIV

RESULTADOS DE LA SERIE B -II (HEMBRAS)

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO 8ª SEMANA DE VIDA	PESO AL MORIR	HALLAZGOS DE AUTOPSIA
1	376	190	460	Tumor de 6x5x4 cm. subcu- táneo en región pectoral derecha.
2	376	190	380	Sin hallazgos
3	376	190	390	Sin hallazgos
4	376	190	290	Sin hallazgos
5	376	190	440	Sin hallazgos
6	376	190	360	Sin hallazgos
7	376	190	340	Sin hallazgos
8	376	190	460	Sin hallazgos
9	376	190	420	Sin hallazgos
10	376	190	370	Sin hallazgos
11	376	190	630	Tumor subcutáneo en re- gión pectoral dcha. de 290 gr. y 14x9x7 cm.
12	376	190	400	Tumor ovoideo de 4x4x3 cm subcutáneo a nivel de hi- pocondrio derecho.
13	376	190	310	Sin hallazgos
14	376	210	265	Sin hallazgos
15	376	210	310	Sin hallazgos
16	376	210	320	Sin hallazgos
17	376	210	450	Sin hallazgos
18	376	210	390	Sin hallazgos
19	376	210	420	Sin hallazgos
20	376	210	275	Absceso en lóbulo infe- rior de pulmón izdo.
21	376	190	305	Neumonía bilateral abs- cesificada.

GRAFICA XIV

RESULTADOS DE LA SERIE B₁-II (HEMBRAS) (Cont. 1)

CASO	SUPERVIVENCIA DÍAS	PESO 8ª SEMANA DE VIDA	PESO AL MORIR	HALLAZGOS DE AUTOPSIA
22	376	190	360	Sin hallazgos
23	376	190	290	Sin hallazgos
24	376	190	370	Sin hallazgos
25	376	190	260	Sin hallazgos
26	376	190	510	Tumor subcutáneo en re- gión pectoral dcha. de 230 gr. y 9x9x8 cm.
27	376	190	450	Sin hallazgos
28	376	190	360	Sin hallazgos
29	376	190	350	Sin hallazgos
30	376	190	290	Sin hallazgos
31	376	210	390	Sin hallazgos
32	376	210	340	Sin hallazgos
33	376	210	350	Tumor de 2x1x1 cm. a ni- vel subcutáneo en hipo- gastrio izdo.
34	376	210	360	Sin hallazgos
35	376	210	340	Sin hallazgos
36	376	210	430	Sin hallazgos
37	376	210	380	Sin hallazgos
38	376	210	340	Sin hallazgos
39	376	210	390	Neumonía abscesificada bilateral.
40	376	210	340	Sin hallazgos
41	376	210	300	Sin hallazgos

GRAFICA XIV

RESULTADOS DE LA SERIE B-II (HEMBRAS) (Cont. 2)

CASO	SUPERVIVENCIA DIAS	PESO 8ª SEMANA DE VIDA	PESO AL MORIR	HALLAZGOS DE AUTOPSIA
42	376	210	250	Sin hallazgos
43	376	210	410	Sin hallazgos
44	376	210	280	Sin hallazgos
45	376	210	340	Tumor ovoideo de 2x2x2 cm. región mamaria izda.
46	376	210	490	Sin hallazgos
47	376	210	270	Sin hallazgos
48	376	210	270	Sin hallazgos
49	376	210	300	Sin hallazgos
50	376	210	340	Tumor en región mamaria izda. de 110 gr. de peso y mide 10x8x7 cm.

SERIE B

G R A F I C A - XV

N°CASOS		Σ GR. PESO 8° SEMANA	Σ GR. FINAL DE LA VIDA	SUPERVIVENCIA DIAS
SERIE B-I	46	$\bar{X}=199.565 \pm 10.101$	$\bar{X}=499.674 \pm 54.092$	376.000
SERIE B-II	50	$\bar{X}=200.800 \pm 10.069$	$\bar{X}=362.700 \pm 74.342$	376.000

El cálculo de las probabilidades de las diferencias de medias intergrupo, indica que hay diferencias significativas con respecto al peso final, entre los machos de la serie A y machos de la serie B $P = 0.005$ y también entre las hembras de la serie A en relación con las hembras de la serie B $P = 0.005$.

2.15

Fig. 89.- Aspecto macroscopico de una neoplasia subcutanea localizada a nivel toracico, bien delimitada cuya superficie de sección muestra una tipica disposición nodular. En el estudio microscopico se demuestra que correspondía a un fibroadenoma de mama. (Serie BII n°51).

225



Fig. 91.- Parenquima pulmonar con focos de bronconeumonía.
(Serie BII nº21).

Fig. 90.- Aspecto macroscópico externo de un fibroadenoma
de mama. (Serie BII nº1).

227



Fig. 92.- Imagen microscopica correspondiente a un fibro-
adenoma mamario en el que se observana abundantes
estructuras ductales rodeadas de una abundante
proliferación fibroblastica. (Serie BII n°11
H.E. apro. 100 x).

Fig. 93.- Fibroadenoma mamario en el que el estroma fi-
broso se dispone en forma concentrica en tor-
no a las celulas glanduloides. (Serie BII n°26
H.E. apro. 100 x).

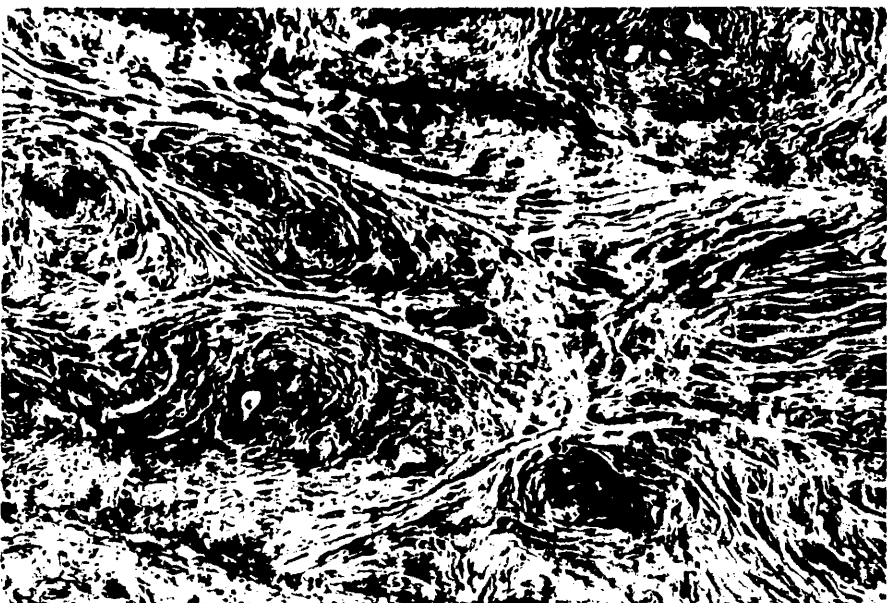
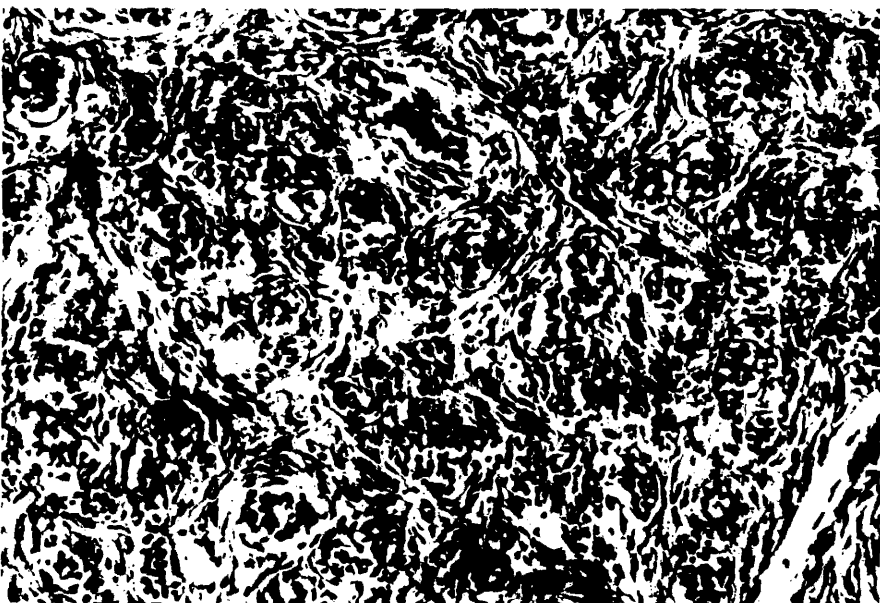
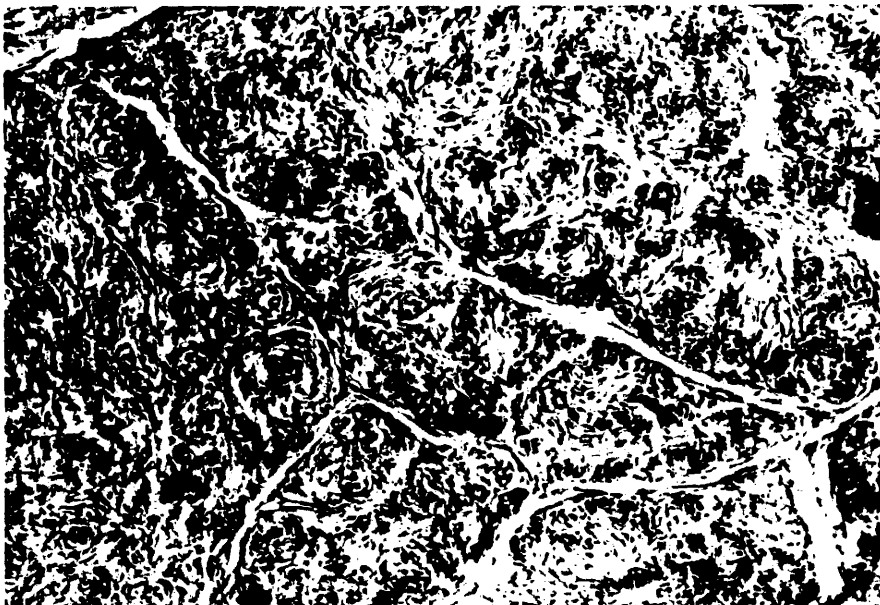


Fig. 94.- Imagen microscópica de adenosis mamaria.
(Serie BII n°1, H.E., Apro. 100 x).

Fig. 95.- Mismo caso que la figura anterior. Se observa
el isomorfismo celular y membranas basales glan-
dulares bien definidas. (Serie BII n°1, H.E.,
apro. 350 x).



28/G11

DISCUSSION

SERIE - AI

1) CON RESPECTO A LA RESPUESTA TUMORAL

Los resultados obtenidos en nuestra serie, muestran que el 82% de las ratas a las que se administró el carcinógeno, desarrollaron tumor; estos hallazgos, aunque algo superiores son concordantes con los obtenidos por otros autores (142,155) que obtienen alrededor del 70% de animales cancerizados utilizando la misma dosis, animal de experimentación y vía de administración. Es inferior a la presentada por autores como Druckrey et al. en 1967 (66), Koestner en 1972 (127), que obtienen del 97 al 100% de tumores cuando emplean la vía intravenosa.

De los animales de esta serie, el 58'4% desarrollaron tumor en la cavidad peritoneal, lugar de la implantación del carcinógeno. Este hecho, creemos que podría ser explicado por la acción tópica de la NMU. La acción carcinogénica de este compuesto en el lugar de aplicación del mismo, ha sido puesta de manifiesto por diversos autores. Graffi y Hoffmen en 1969 (90) aplicaron sobre la piel de ratas y hamsters un goteo de una solución de NMU induciendo la aparición de sarcomas locales. Haas y cols. en 1973 (95) tras inyección subcutánea de NMU produce más de un 65% de sarcomas localizados en el sitio de aplicación (Mohr et al., 1974) (166). Esta acción tópica de la molécula de NMU sería la responsable de la inducción de tumores de esófago y estómago cuando su administración es oral (Vasilieva y Milieuskaya, 1972) (267) o, de tráquea y pulmones cuando se aplica mediante inhalaciones (Hilfrich et al., 1973) (106), (Yarita Tsuton, 1978) (291), (Harris et al. 1975) (98).

La acción tópica de la NMU fue explicada por Druckrey et al. en 1967 (47) considerando que dicha acción es debida a las características químicas de la molécula de NMU para originar directamente diazoalcanos por escisión heterolítica sin requerir de una activación enzimática para su transformación. Esta representaría en sí el agente alquilante a nivel del DNA.

Otros autores como Kelly et al. en 1968 (121), Plallenroth en 1979 (202), no han demostrado la acción tópica de la molécula de MNU cuando se inyectaba intracranealmente. Estos autores no encontraron ningún tumor nervioso y sí, por el contrario, otros tipos tumorales como carcinoma de mama. Este hecho podría ser debido como apunta Kelly et al. en 1968 (121) al empleo de ratas recién nacidas en su trabajo, y a una inmadurez enzimática del sistema nervioso central del animal de experimentación.

Todos los tumores desarrollados en el interior de la cavidad abdominal en nuestra serie, son schwannomas malignos, este dato concuerda con los obtenidos por diversos autores (132,155,

91,518) que encuentran una mayor incidencia de tumores neuroectodérmicos inducidos en las proximidades del lugar de aplicación del carcinógeno en relación con otros tipos de neoformaciones; sin embargo, estos mismos autores, a diferencia de nosotros, presentan en sus estadísticas la aparición de diversas neoplasias no nerviosas como nefroblastomas, angiosarcomas, carcinomas de páncreas, adenocarcinomas de intestino, etc. No obstante, su baja incidencia y la ausencia de un organotropismo claro por cualquiera de estos órganos, junto con nuestros hallazgos

confirman los trabajos iniciales de Druckrey et al. en 1964 y 1967 (62,66) sobre la especificidad de la NMU para producir tumores nerviosos periféricos. Otros autores como Terracini en 1970 (261) Rao et al. en 1977 (218) no reportan ni un solo caso en sus estudios de tumores nerviosos periféricos inducidos por NMU cuando la inyectan intraperitonealmente.

Autores como Vasilievaad Milieuskaya en 1972 (267), Haas et al. en 1973 (95), Morh et al. en 1974 (166), corroboran la acción carcinogénica tópica de la NMU, pero para estos, la mayoría de los tumores desarrollados son sarcomas o rhabdomyoblastomas.

Nosotros pensamos que estos hallazgos no son tan dispares como puede pensarse a primera vista, pues según Sobel et al. en 1981 (246) los tumores nerviosos periféricos pueden presentar amplias zonas de transformación metaplásica hacia sarcomas o rhabdomiosarcomas, lo que podría ser quizás el puente de unión entre los hechos referidos por los diferentes investigadores. Nosotros también hemos observado que algunos de nuestros casos mostraban imágenes indistinguibles de rhabdomiosarcomas pero la seriación o los estudios de otros campos indicaban su carácter de schwannoide que parecía predominar en la neoformación.

En nuestra serie tan solo se desarrolló un tumor nervioso periférico en un sitio lejano del lugar de implantación del carcinógeno, caso n°9, que se localizó en corazón. La aparición de tumores en sitios alejados de la aplicación del carcinógeno ha sido también puesta de manifiesto por otros autores como Druckrey et al. en 1967 (66), Thomas et al. en 1968 (263), Hiraki en 1971 (110), Harris et al. en 1973 (98). Este hallazgo indicaría

que la molécula tiene un neurotropismo y además acción carcinogénica a distancia del sitio de implantación.

En resumen, consideramos que la NMU muestra una especial predilección por la inducción de tumores nerviosos periféricos, habiendo constatado los efectos carcinogénicos tópicos y a distancia de esta sustancia; sin embargo, no hemos encontrado en esta serie, constituida por ratas macho, una acción carcinogénica generalizada, como luego veremos en las hembras. Así se produjeron tumores nerviosos junto a otros tipos tumorales. Creemos que este hecho es más imputable a la cantidad de la serie (44) que a una característica diferencial sexual.

En nuestros hallazgos el 25'6% de los animales desarrollaron tumores nerviosos centrales en el interior de la cavidad craneal y ninguno medular. Estas cifras son discretamente inferiores a las presentadas por autores como Koestner y cols. en 1972 (127) que encuentran un 36% con la misma vía de administración y a una dosis total de 180 mg/kg. y similares a otras series (155) que con el empleo de la misma dosis y vía de administración encuentran un 24%.

La incidencia de tumores nerviosos centrales desarrollados está en relación directa con la vía de administración del carcinógeno. En los trabajos de Koestner se observa la variación en la incidencia de estos tumores según la vía de administración del carcinógeno. Así con una dosis total de 180 mg/kg en 60 animales, la incidencia de tumores nerviosos alcanzó el 97% cuando se

emplea la vía intravenosa, mientras que los tumores no nerviosos producidos tras el empleo de esta vía fue del 19%. La aplicación del carcinógeno por vía oral produce un 52% de tumores nerviosos y un 80% de tumores en otras localizaciones. Al emplear la vía intraperitoneal el número de tumores nerviosos desciende al 36% y aparecen un 64% de otros tipos de neoplasias. Por último, por vía subcutánea es cuando aparecen menor cantidad de tumores nerviosos (12%) y mayor cantidad de otros tipos tumorales (83%).

Druckrey et al. en 1967 (67) también encuentran hallazgos similares al aplicar el carcinógeno por vía intravenosa y observar que 24 de las 34 ratas, presentan tumores malignos cerebrales.

Todos los tumores desarrollados en nuestra serie eran oligodendrogliomas. Las series de Druckrey et al. en 1967 (66); Stroobandt y Brucher en 1968 (253); Zulch y Mennel en 1970 (295); Koestner et al. en 1972 (127),, muestran de acuerdo con nosotros una mayor incidencia de gliomas, principalmente oligodendrogliomas en relación a otros tumores nerviosos. Sin embargo, a diferencia de nosotros encuentran otros tipos de tumores distintos.

II) SOBRE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS TUMORES DESARROLLADOS

A) DE LOS TUMORES NERVIOSOS PERIFERICOS

Los tumores que hemos obtenido con la administración de NMU , se caracterizan en el estudio macroscopico en general, por su gran tamaño, consistencia blanda, sin cápsula aparente y con abundantes áreas de necrosis y hemorragia . Otros autores (88 84 ; 187) encontraron con el empleo de NMU por distintas vías que los tumores nerviosos periféricos desarrollados, presentaban características morfológicas semejantes. También son similares los caracteres generales morfológicos presentados por las neoplasias inducidas por otros carcinógenos del grupo de la urea como la ENU (Cardesa et al., 1977) (45), (Merchan et al., 1974), 187 (Pfaffenroth , 1979) (202). Por otro lado al estudio con microscopio óptico suelen adoptar un patrón estoriforme cuyas células presentan aspecto fusiforme de contornos mal definidos, citoplasma eosinófilo y núcleos ovalados de cromatina densa. No se suelen encontrar imágenes de diferenciación organoide, por el contrario con relativa frecuencia en el espesor y periferia de estos tumores, aparecen troncos nerviosos de forma y tamaño variable. Estos hallazgos son semejantes a los encontrados por otros autores (166 ; 187 ; 255).

Asimismo, las características son superponibles a las que presentan estos tumores cuando son inducidos por otras sustancias del grupo de la urea (Cardesa et al., 1974) (44), (Koestner, 1972) (127).

La presencia de troncos nerviosos en estos tumores en la patología humana se considera como diagnostico de enfermedad de Von Reklinghausen (Harkin y Reed, 1969) (96).

Los criterios seguidos para diagnosticar la malignidad, se basaron en la presencia de mitosis atípicas, polimorfismo celular, anisocariosis, pérdida de la relación núcleo citoplasma e invasión y destrucción de estructuras adyacentes por células neoplásicas y comportamiento biológico que conduce a la muerte del animal portador.

Como comentamos en el apartado de resultados, hubo casos en los que la tipificación histológica fue muy difícil, debido al gran polimorfismo y atipias celulares, presencia de gran cantidad de células multinucleares, y a la disposición de estas que no adoptaban un patrón definido. En estos casos se plantearon diagnósticos diferenciales con diversos tipos tumorales, principalmente con sarcomas polimorfos, rhabdomyosarcomas, leiomyosarcomas, liposarcomas, histiocitomas malignos, e incluso melanomas. Para esclarecer estos ejemplos fueron útiles las tinciones histológicas específicas, P.A.S., Reticulina, Masson, Hematoxilina fosfotungstica (PTH), pero sobre todo el realizar múltiples cortes a distintos niveles del tumor y el empleo de microscopía electrónica de transmisión. Estas áreas de pleomorfismo y atipias celulares se encontraban en las zonas próximas a áreas de necrosis o en zonas en las que se produce la invasión tumoral de estructuras adyacentes. Estas observaciones han sido apuntadas por autores como Denlinger et al. en 1974 (58), Swenberg

en 1972 (255), Bullón et al. en 1973 (39), quienes consideran estos hallazgos como una respuesta celular condicionada por el entorno inadecuado en el que se encuentran estas células para su supervivencia, que sería la responsable de estas transformaciones morfológicas, y además, no implicaría una mayor malignidad evolutiva. Asimismo en 1981 Sobel et al. (246) apuntan que estos tumores pueden sufrir transformaciones metaplásicas con aparición tanto de elementos benignos como malignos, siendo entre estos últimos los más frecuentes los focos de rabdomiosarcoma, liposarcoma, sarcoma osteogénico, así como la potencialidad de la célula de Schwann de actuar como fibroblasto facultativo, produciendo gran cantidad de colagena o de producir melatina. Nuestros hallazgos se correspondían con las observaciones apuntadas por estos autores y también hemos comprobado que la supervivencia de los animales cuyos tumores mostraron las imágenes histológicas más atípicas no fuera menor a la de los animales cuyo tumor mostraba un patrón claramente definido.

B) DE LOS TUMORES NERVIOSOS CENTRALES

Todos los tumores nerviosos centrales encontrados en nuestra serie eran oligodendrogliomas, y, en la mayoría de los casos, no se observaron alteraciones macroscópicas significativas al extraer el encéfalo.

El estudio con el microscopio óptico los evidenció. Existe en general una predilección por localizarse intrahemisférica-

mente en zonas próximas a los ventriculos laterales. En los resultados obtenidos por autores como Koestner en 1972 (127), Swenberg et al. en 1972 (255), Denlinger et al. en 1974 (58), Koestner et al. en 1971 (126) y Plaffenroth en 1979 (202), la localización de estas neoplasias eran semejantes a la observada por nosotros, sin embargo no hemos hallado desarrollo tumoral en tronco, cerebelo o médula, como refieren, aunque en proporción muy escasa. Similares localizaciones presentan los tumores del sistema nervioso central inducidos por otros derivados del grupo de la urea (80, 84, 155, 187), aunque el tamaño tumoral alcanzado en estos casos es mucho mayor, siendo frecuente que el tumor reemplace totalmente un hemisferio.

La imagen histológica de estas neoformaciones se manifestó como una proliferación celular de límites bien definidos constituida por células de características oligodendrogliales, con citoplasma claro de límites bien definidos y núcleos centrales de cromatina densa siendo poco frecuentes las imágenes de mitosis.

En los estudios realizados por Druckrey et al. en 1967 (67), Koestner et al. en 1972 (127), Stroobandt y Brucher en 1968 (253), Zulch y Mennel en 1970 (295), Swenberg et al. en 1972 (255), Denlinger et al. en 1974 (58), Cardesa et al. en 1977 (45), son los oligodendrogliomas los tumores nerviosos más frecuentemente desarrollados, y las características morfológicas que presentan son similares a las de nuestra serie. Sin embargo,

estos autores encuentran también otros tipos tumorales son astrocitomas, tumores de estirpe ependimaria, gliomas mixtos, etc. Quizas en nuestras series la vía de administración del carcinógeno condicionó la aparición de tumores intraabdominales que indujeron al deterioro progresivo de los animales y su muerte, quizás no hubo tiempo de que se desarrollara en el sistema nervioso central otras estirpes tumorales además de los oligodendrogliomas encontrados. En favor de esta idea estaría el hecho comprobado, de la menor supervivencia de los animales y el elevado número de tumores producidos a nivel abdominal en las series de animales del presente trabajo.

Taper et al. en 1970 (259) demuestran una menor cantidad de nucleasas en los oligodendrocitos, que opinan podría condicionar una mayor susceptibilidad al carcinógeno, lo que quizás justificaría la alta incidencia de este tipo tumoral.

C) SOBRE LOS CARACTERES ULTRAESTRUCTURALES

La microscopía electrónica es una técnica de gran utilidad para el diagnóstico de las neoplasias, en aquellos casos en los cuales la interpretación mediante el microscopio óptico ha llegado a los límites de sus posibilidades, y no permite establecer un diagnóstico definitivo. Un grupo de neoplasias cuya caracterización se ha visto enormemente beneficiada por la aplicación de dicha técnica es, precisamente, las derivadas de los nervios periféricos, sobre todo en los casos de gran indiferenciación o

pleomorfismo celular, que son a menudo indistinguibles en microscopía óptica de algunas variedades de sarcomas.

Los hallazgos ultraestructurales significativos para realizar el diagnóstico de schwannoma, han sido descritos tanto en las propias células neoplásicas como en el espacio intercelular. Los dos hechos más característicos son la presencia de membrana basal en relación con la superficie externa de la membrana celular y la presencia de colagena de período largo en el intersticio, que está con frecuencia en relación con la membrana basal (10). La membrana basal en los schwannomas puede ser muy prominente y continua, lo cual es característico de las formas benignas, o discontinua y poco aparente, disposición que con frecuencia adopta en las formas malignas, incluso en las metastatizantes (Alvira et al., 1976) (10). Las membranas adyacentes pueden estar relacionadas por uniones tipo demosoma. Es más característica la presencia en el citoplasma de la célula de Schwann de axones o de figuras mielínicas y cuerpos lisosomales. Las figuras mielínicas probablemente corresponden a axones degenerados (Ghadially, 1989) (86).

Especial atención merece como dato de valor en el diagnóstico electromicroscópico de los schwannomas, la presencia frecuente, pero no constante, de colagena fibrosa de período largo (de 110 a 220 nanómetros), constituyendo acúmulos organizados extracelularmente, que se han denominado "cuerpos de Luse" (Ghadially, 1980; Taxy y Battifora, 1980; Erladson, 1981) (86, 260, 77). Este hallazgo aunque característico de los

schwannomas, no es patognomónico de los mismos (Taxy y Battifora, 1980) (260), ya que aparece en otras entidades, tales como en casos de fascitis nodular, lipoma fusocelular, leiomioma orbitario (Jacobiec y Font, 1979) (118), matriz del cartilago osteoartrosico (Ghadially, 1981) (85), timomas (Rosal)137, (81)

La presencia en los neurofibrosarcomas de células neoplásicas indiferenciadas, que se asemejan a células mesenquimales de caracter fibroblástico, es un hecho que conviene tener en cuenta a la hora de valorar los hallazgos ultraestructurales en este tipo de tumores. Es fundamental asimismo, tener presente que estos tumores pueden sufrir transformación metaplásicas, con aparición tanto de elementos metaplasicos benignos, como malignos, siendo entre estos últimos los más frecuentes los focos de rabdomiosarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y liposarcoma, así como la potencialidad de la célula de Schwann de actuar como fibroblasto facultativo, produciendo grandes cantidades de colagena, o de producir melanina (Sobel et al., 1981) (246).

La entidad que tal vez ofrezca mayor dificultad respecto a su diagnóstico diferencial con el schwannoma maligno, son las neoplasias fibroblásticas, sobre todo las fusocelulares de disposición fascicular con ocasional presencia de áreas en las cuales los núcleos se disponen en empalizadas, similares a los schwannomas. El diagnóstico diferencial con neoplasias constituidas por células musculares lisas, también habrá de ser tenido en cuenta, si bien en este segundo caso la microscopía electrónica

no suele ofrecer dudas. Respecto a los hechos morfológicos que permiten establecer un diagnóstico diferencial, desde el punto de vista ultraestructural, entre una neoplasia fibroblastica y un schwannoma maligno, hay que considerar no sólo los caracteres ultramicroscopicos referidos anteriormente como típicos schwannomas, sino también la ausencia de hechos morfológicos propios de las células de estirpe fibroblastica. En este sentido, la ausencia de membrana basal y la presencia de un retículo endoplasmico rugoso prominente, favorece el diagnostico de tumor fibrosarcomatoso. De menor significado es la presencia de colágena, que puede aparecer en ambos tipos tumorales, ya que también es producida por la célula de Schwann (Thomas,1964) (262)

III) SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES AL CARCINOGENO

La supervivencia media de los animales de esta serie fue de $\bar{X}=115,718 \pm 57,150$ días, que comparada con las supervivencias que presentan otros autores (Koestner et al., 1972) (127), (Druckrey et al., 1967) (67), vemos que es considerablemente inferior en nuestra serie, si bien la dosis de carcinógeno administrada por nosotros es mayor.

Koestner et al., en 1972 encontró una supervivencia de 205 ± 62 días, con una dosis total de 180 mg/kg de NMU. Druckrey et al. en 1967 con la misma dosis alcanza una supervivencia de 240 a 300 días, y nosotros con una dosis total de 240 mg/kg. encontramos una supervivencia media de 115 ± 57 días.

A la vista de estos datos, podemos concluir que la supervivencia de los animales está más en función de la dosis del carcinógeno que del tipo tumoral desarrollado, aunque como es lógico pensar, a dosis idénticas la supervivencia va a estar en función del tipo de tumor y localización del mismo.

En nuestro estudio determinados las supervivencias de los animales en función de la localización y tipo de tumor desarrollado (estos hallazgos están reflejados en la Gráfica VI), a la vista de los mismos podemos observar que la supervivencia de los animales que desarrollaron tumor en cavidad abdominal es de $114,609 \pm 51,767$ días, algo inferior a la que presentaron los animales que presentaban tumor de localización intracraneal que fue

de $147,900 \pm 68,071$ días. Estos hallazgos son similares a los presentados por otros autores (155,86,66). Estos autores consideran que el tiempo de inducción es menor en los tumores nerviosos periféricos mientras que los tumores gliales aparecerían más tarde. En nuestros hallazgos, el cálculo de probabilidades de las diferencias de medias intergrupo con respecto a la supervivencia de los animales que desarrollaron tumor en cavidad abdominal, en relación con los que desarrollaron tumor en cavidad craneal, a pesar de que existen, desde el punto de vista estadístico no son significativas.

Un dato que a nuestro juicio merece interés, es que el grupo de animales de esta serie que no desarrollaron tumor fueron los que tuvieron una supervivencia menor ($\bar{X}=88,857 \pm 47,775$ días) en relación con los otros grupos. Las diferencias más significativas de supervivencia de estos animales con el grupo que desarrolló tumor intracraneal mostraron en el estudio del cálculo de probabilidades diferencias de medias intergrupo un valor de $p=0.021$. No hemos encontrado en la literatura referencia al hecho de que los animales que han recibido carcinógeno y no han presentado respuesta tumoral presenten una supervivencia menor.

La supervivencia del grupo que no desarrolló tumor estaba comprendida entre 40 y 175 días. La cifra menor en cualquier caso, no descartaría la muerte del animal por los efectos tóxicos inmediatos de anemias aplásicas, hemorragias intestinales, etc. del carcinógeno, puestos de manifiesto por Druckrey en 1967. La fecha de supervivencia máxima de este grupo (175 días) nos

lleva a descartar la hipótesis de que estos animales no desarrollaron tumor porque su supervivencia fuera demasiado corta, ya que existen animales que sí desarrollaron tumor y presentaron una supervivencia inferior. También podríamos pensar que este grupo de animales se mostraron "resistentes" a la acción del carcinógeno, sin embargo, al comparar las supervivencias de este grupo con la serie control vemos que se encuentran muy por debajo de la de los animales testigos.

Nosotros creemos que existe una acción tóxica del carcinógeno sobre estos animales, sin embargo, no responden con la cancerización de los mismos, quizás debido a la respuesta individual, y en suma, indescifrable que presenta un organismo frente a un carcinógeno. La acción general y no estrictamente carcinogénica de la NMU se observó en la casi totalidad de los animales que presentaron alteraciones del pelaje, que era áspero, con cambios en la coloración, adelgazamiento y hasta caquexia Druckrey et al., 1967 (67), Koestner et al., 1972 (127) refieren hallazgos semejantes.

En resumen consideramos que la supervivencia de los animales en primer lugar, esta en función directa de la dosis del carcinógeno. Asimismo, la supervivencia de los animales inyectados que no desarrollaron tumor es inferior y estadísticamente significativa con respecto a los animales en los que se originó alguna neoplasia.

SERIE - AII

Con la idea de no caer en la repetición de los hechos ya discutidos en la serie anterior, pero debido al planteamiento por separado de las mismas según el sexo, solo hablaremos de forma muy esquemática en la discusión de esta serie. Asimismo, haremos hincapié en las diferencias entre ambos grupos. Seguiremos los mismos apartados indicados en la Serie AI.

I) CON RESPECTO A LA RESPUESTA TUMORAL

Los resultados obtenidos en esta serie demuestran que el 72'8% de los animales a los que se administró NMU desarrollaron tumor. Estos hallazgos son semejantes a los presentados por otros autores (155, 132), y discretamente inferiores con relación a la serie AI, en la que se presentaron el 82% de tumores.

En los animales de esta serie, en el 45'4% se evidenció la existencia de un tumor en el interior de la cavidad peritoneal. Este hecho nosotros lo creemos justificado en gran medida a la acción tóxica de la NMU. Esta acción tóxica ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores como Graffi y Hoffman en 1975 (90), Vasilieve y Milieuskaya en 1972 (267), Hilfrich et al., en 1973 (106), Harris et al., en 1975 (98), y explicada desde el punto de vista químico por Druckrey en 1967 (67), como ya indicamos en la discusión de la serie AI.

Todos los tumores desarrollados en el interior de la cavidad abdominal en nuestra serie, fueron schwannomas malignos.

Estos hallazgos coinciden con los presentados por Herrold en 1969 (104), Maekawa y Odashima 1975 (141), Rao y Keddy en 1978 (218), y corroboran la predilección de la molécula de MNU para inducir tumores nerviosos periféricos.

En esta serie se produjeron dos tumores nerviosos periféricos en lugares lejos del sitio de implantación del carcinógeno. La aparición de neoplasias en sitios alejados de la aplicación del carcinógeno ha sido también constatada en animales de la serie anterior y puesta de manifiesto por investigadores como Druckrey et al en 1967 (67), Thomas et al en 1968 (263), Hiraki en 1971 (110), Harris en 1973 (98) Delinger et al 1974 (958). Estos hallazgos constatan el neurotropismo y la acción carcinogénica de la molécula de MNU.

Como ya dijimos en el capítulo de hallazgos, hemos encontrado también tumores de estirpe no nerviosa. Tres adenocarcinomas de mama y un epiteloma calcificante de Malherbe. Tumores no nerviosos inducidos por la MNU han sido descritos por otros autores como Herrold 1969 (104), Rao y Keddy 1978 (218), Gullino et al 1975 (92), Bets y Willighagen en 1975 (33), Kelly et al 1968 (121). Terracini en 1970 (261).

A diferencia de nosotros, autores como Delinger en 1974 (58), encuentran una alta incidencia de tumores no nerviosos con el empleo de MNU intravenosamente. Los tumores no nerviosos que encuentran otros autores son principalmente carcinomas de

estómago, pulmón, hígado, mama y tumores de estirpe linfoide. También son frecuentes la inducción de tumores renales, sobre todo cuando la administración de NMU es por vía oral y en una sola dosis (Leaver et al., 1968) (134), (Druckrey et al., 1967) (67). En mayor o menor grado con la administración de NMU, se inducen carcinomas mamarios. El número de tumores mamarios inducidos es muy alto en las ratas hembras, con respecto a los machos (Kelly et al., 1968) (121), (Terracini, 1979) (261), (Gullino et al., 1975) (92), (Rao y Keddy, 1978) (218). En algunas series la incidencia de carcinomas mamarios por acción de la NMU es muy alta, hasta el 89% (Gullino et al., 1975) (92), (Bots y Willighagen, 1975) (33), (Terracini, 1979) (261). En nuestra serie la incidencia de carcinomas de mama, solo tres casos, es muy baja si la comparamos con la presentada por estos autores. Ellos emplean el mismo tipo de animal, pero la administración del carcinógeno la hacen por vía intravenosa.

También son altas las incidencias de tumores linfoides tras la administración de NMU (Terracini, 1970) (261). Nosotros no hemos encontrado en nuestras series ningún tumor de estirpe linfoide.

También encontramos un caso de pilomatrixoma, con respecto a la inducción de este tipo tumoral por NMU no hemos encontrado referencia en la literatura.

Según todo lo expuesto anteriormente, podemos resumir diciendo que la NMU muestra una especial predilección por la

inducción de tumores nerviosos periféricos, habiendo constatado los efectos carcinogénicos tópicos y a distancia de esta sustancia, para el sistema nervioso. Asimismo, hemos podido comprobar su acción carcinogénica general.

En nuestros hallazgos, el 21'2% de los animales desarrollaron tumores nerviosos centrales en el interior de la cavidad craneal. Estas cifras son similares a las que aparecen en la serie AI (25'6%) y algo inferiores a las que presentan otros autores como Koestner en 1972 (127), Stroobandt y Brucher en 1968 (253).

Como ya hemos discutido anteriormente la incidencia de tumores nerviosos centrales, esta en relación con la vía de administración del carcinógeno (Koestner, et al., 1972) (127), (Druckrey et al., 1967) (67).

Al igual que ocurriera en la serie anterior, todos los casos fueron diagnosticados de oligodendroglioma, hecho que nos aleja un poco de los hallazgos de otros autores como Zulch y Mennel en 1970 (295), Stroobandt y Brucher en 1968) (253), que aunque presenten en sus estudios los oligodendrogliomas como los tumores nerviosos centrales desarrollados más frecuentemente, sin embargo, encuentran otros tipos tumorales nerviosos distintos como gliomas mixtos, astrocitomas, tumores de estirpe ependimaria, etc. Estos hallazgos ya han sido discutidos ampliamente en la serie AI.

En resumen, podemos considerar que la NMU muestra una especial predilección en la inducción de tumores nerviosos centrales, cualquiera que sea su vía de aplicación, siendo los tumores oligodendrogiales los que se inducen con mayor frecuencia.

II) SOBRE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS TUMORES DESARROLLADOS

A) DE LOS TUMORES NERVIOSOS PERIFERICOS

Los tumores obtenidos en esta serie al igual que en la anterior, se caracterizan desde el punto de vista macroscópico, por su tamaño, ausencia de cápsula bien definida, con amplias zonas de necrosis y hemorragia, con frecuencia presentan un aspecto quístico esponjoso. Estas características son similares a las que presentan otros autores como Merchan et al. en 1974 (187), Delinger en 1974 (58), siendo similares a las características que presentan estos tumores cuando son inducidos por otros carcinógenos del grupo de la urea (Cardesa et al., 1977) (45), (Phaffenroth, 1979) (202). Las características microscópicas son semejantes a las presentadas por la serie AI y han sido discutidas anteriormente.

Hubo casos, como en la serie anterior, que mostraban intenso pleomorfismo y un patrón histológico no definido de nuevo nos planteó problemas difíciles de diagnóstico diferencial con otras estirpes tumorales (histiocitomas malignos, leiomiomas, fibrosarcomas, rhabdomiomas, liposarcomas) que fueron resueltos con el estudio minucioso de múltiples cortes, tinciones histológicas especiales, e incluso con la microscopía electrónica. Ya hemos discutido que estas áreas de dediferenciación tumoral pueden estar presentes en los tumores nerviosos periféricos.

(Sobel et al. en 1981) (246) y ha sido encontrada en las series de otros autores (Swenberg, 1972) (255), (Denlinger et al., 1974) (58)

En resumen, consideramos que los tumores nerviosos periféricos desarrollados en esta serie, muestran las mismas características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas, que los desarrollados en la serie AI y merecen las mismas consideraciones allí expuestas.

B) DE LOS TUMORES NERVIOSOS CENTRALES

Los tumores desarrollados en el sistema nervioso central de los animales de esta serie, fueron siete, de los cuales cuatro condicionaban alteraciones macroscópicas visibles a la inspección del encéfalo. En tres de estos casos, se observó una zona de aproximadamente 0'2 cm. de coloración rojiza amarillenta en la superficie cerebral, y el caso cuarto se manifestó como un tumor ovoideo intrahemisférico de 0'5 cm. de diámetro, los otros tres casos restantes hasta los siete obtenidos, fueron hallazgos microscópicos.

Los siete casos eran oligodendrogliomas cuya localización (intrahemisféricamente, próximos a los ventrículos laterales) es semejante a la que encuentran otros autores como Koestner et al., en 1972 (127), Swenberg et al., en 1972 (255), Delinger et al. en 1974 (58), Bullón et al., en 1973 (39). Las características microscópicas han sido comentadas en el apartado de re-

sultados, son semejantes a las presentadas por estos mismos tumores desarrollados en la serie AI, y concuerdan con los hallazgos obtenidos por Druckrey et al. en 1967 (67), Koestner et al. en 1972 (127), Stroobandt y Brucher en 1968 (253), Zulch y Mennel en 1970 (295), Delinger en 1974 (58). En las series de estos autores, como discutimos anteriormente, los oligodendrogliomas fueron los tumores que se desarrollaron con mayor frecuencia, sin embargo, a diferencia de nosotros, ellos encuentran otros tipos tumorales nerviosos distintos.

En resumen, podemos considerar que las características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas de los tumores nerviosos centrales inducidos por la administración de NMU en esta serie, son análogos a los de la serie AI.

C) DE LOS RESTANTES TIPOS TUMORALES

En esta serie constituida por ratas hembras, a diferencia de la serie AI, constituida por machos, se desarrollaron otros tipos tumorales que no eran de estirpe nerviosa. Los tumores no nerviosos encontrados, fueron tres carcinomas mamarios y un pilomatixoma.

Los casos de carcinoma mamario, se trataba de tumoraciones subcutáneas de consistencia firme, coloración sonrosada, no capsulados y firmemente adheridos a planos adyacentes. El tamaño de estos tumores osciló entre 4x3x2cm. y 2 cm de diametro.

Estas características macroscópicas son similares a las encontradas por Terracini en 1970 (261), Kelly et al. en 1968 (121) Gullino et al. en 1975 (92), Bots y Willighagen en 1975 (33), Pfaffenroth en 1979 (202). Estos hallazgos son superponibles a los que presentan los tumores mamarios en la especie humana (Haagenzen, 1979) (94).

Al estudio microscópico se encontraban constituidos por formaciones glanduloides de disposición anárquica, tamaño y forma variables, revestidos por una o varias hileras de células de contornos poliédricos, citoplasma claro y núcleos dismórficos como imágenes de mitosis atípicas. En un caso la proliferación glanduloide adoptaba un patrón lobulillar. Estas imágenes son similares a las descritas por Bots y Willighagen en 1975 (33), Gullino et al. en 1975 (92), Terracini en 1970 (261). También son similares a las que presentan los tumores mamarios inducidos por otros carcinógenos.

El pilomatrixoma adoptaba el aspecto de una tumoración en el maxilar inferior de 3x2x2 cm. adherido a planos profundos, de consistencia firme. Al corte era nodular. En el estudio con microscopio óptico, mostró el depósito de gran cantidad de sales de calcio y queratina, siendo frecuente visualizar las células en sombra de esta neoformación.

No hemos encontrado en la literatura referencia al desarrollo de pilomatrixoma dependientes de la administración de carcinógeno NMU. Nosotros pensamos que nuestro caso no debe ser consi-

derado como significativo, sino como un hallazgo casual hasta que se encontraran otros casos análogos.

D) SOBRE LOS CARACTERES ULTRAESTRUCTURALES

Las características ultraestructurales de los casos estudiados en esta serie, son semejantes a las presentadas por la serie AI, en cuyo apartado han sido descritas ampliamente.

III) SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES AL CAPCINOGENO

La supervivencia media de los animales de esta serie fue de $X=126,636 \pm 62,491$ días, que es algo superior a la presentada por la serie AI. Sin embargo, al igual que la serie de machos, es sensiblemente inferior a las presentadas por Koestner et al. en 1972 (127), Druckrey et al. en 1967 (67).

En el apartado anterior hemos discutido estas diferencias de supervivencia. A las consideraciones efectuadas en el apartado de la serie AI, debemos indicar aquí que la comparación de las supervivencias de ambas series con el estudio estadístico, no mostró diferencias significativas.

En nuestro estudio determinamos las supervivencias de los animales, en función de la localización y del tipo tumoral desarrollado. Estos hallazgos quedan reflejados en la gráfica XII. A la vista de ella, podemos observar que la supervivencia de los animales que desarrollaron tumor en la cavidad abdominal fue de $139,333 \pm 51,142$ días, y es algo inferior a la que presentaban los animales con tumor de localización craneal que es de $150,571 \pm 58,143$ días, y a su vez la supervivencia de los animales con tumor en cavidad craneal es inferior a la de los animales que desarrollaron tumor en sitio distinto de la cavidad abdominal y craneal, que fue de $184,833 \pm 46,744$ días. Estos hallazgos son similares a los presentados por otros autores (155,), quienes consideran que el tiempo de inducción es menor en los tumores nerviosos perifé-

rícos que en los tumores nerviosos centrales. A la vista de nuestros hallazgos, añadiríamos que la inducción de los tumores nerviosos periféricos es menor que la inducción de ningún otro tipo tumoral. Estos hallazgos, en una primera aproximación son como se ha indicado, pero nosotros además, como se dijo en el capítulo de resultados, hemos aplicado el cálculo de probabilidades de las diferencias de medias intergrupo con respecto a la supervivencia de los animales de estos. Este estudio demuestra que a pesar de que existan, no son significativas estas diferencias.

Los animales que desarrollaron tumor en esta serie, representan en el 27'2% de los mismos; la supervivencia media de ellos fue de $71,333 \pm 51,179$ días. Al igual que ocurriera en la serie AI los animales que no desarrollaron tumor tras la aplicación del carcinógeno, fueron los que presentaron una supervivencia menor. Esta diferencia es significativa desde el punto de vista estadístico, al compararla con la presentada por los animales de otros grupos. Así, el cálculo de probabilidades de las diferencias de medias intergrupo, indica que existen diferencias significativas con respecto a la supervivencia entre los animales que no desarrollaron tumor en relación con los animales de los otros grupos con una $P = 0.005$.

Como hemos comentado anteriormente, no hemos encontrado referencia en la literatura al hecho de que los animales que no desarrollan respuesta tumoral al carcinógeno, presentan una supervivencia menor, y ya hemos indicado en la serie AI la explicación que consideramos podría tener este hecho.

247

CONCLUSIONES

Se han estudiado 83 ratas wistar a las que se les administro metilnitrosourea en la cavidad peritoneal. Se mantuvieron hasta su muerte espontanea y se compararon los hallazgos con los de un grupo control constituido por 96 ratas. Se efectuó el estudio anatomopatológico de los tumores desarrollados y el análisis estadístico de diversos parametros como inducción, tipo, tamaño y localización tumorales; supervivencia de los probandos y respuesta a la metilnitrosourea segun el sexo, lo que nos condujo a las siguientes conclusiones:

1) El trabajo presentado confirma una vez mas que la metilnitrosourea tiene propiedades carcinogenicas en la rata wistar; la inyección intraperitoneal de 10mg/kg de metilnitrosourea cada siete dias desde la octava hasta la treintadosava semanas de vida es una pauta de administración facil y eficaz que conduce a que el 80,7% de los animales inyectados desarrollen neoplasia.

2) La metilnitrosourea induce en la rata la aparición de tumores, en el lugar de la inyección y a distancia, analogos en su morfobiología a tumores de la especie humana, por lo que se puede considerar un modelo de carcinogenesis quimica idoneo.

La extrapolacion de los resultados al hombre ha de ser efectuada con gran prudencia debido a las diferencias existentes entre ambas especies.

3) Los tumores desarrollados tuvieron un comportamiento maligno conduciendo a la muerte precoz de los animales portadores respecto a los del grupo testigo. Constantemente en todos se demostro ausencia de capsula asociada a infiltracion y destruccion de los tejidos adyacentes a donde estaban implantados. A menudo, los elementos celulares que constituian las neoplasias presentaban isomorfismo y escasa actividad mitotica.

4) La morfologia de los tumores observados tienen características similares a los schwannomas, oligodendrogliomas, carcinomas mamarios y mas raramente otros tumores humanos. El 66,1% corresponden a tumores del sistema nervioso periferico y el 27,4% a tumores del sistema nervioso central.

5) Las neoplasias originadas en el lugar de la inyeccion de la metilnitrosourea, (cavidad peritoneal), corresponde a schwannomas malignos. Pueden presentar algunas zonas muy polimorfas con grandes atipias e incluso con caracteres morfologicos histogeneticos distintos a los de la mayor parte de la neoformacion, (por ejemplo areas morfologicamente compatibles con rabdomiosarcomas, fibrosarcomas, liposarcomas,

etc) que estan muy estrechamente relacionadas con fenomenos de isquemia o se situan en los margenes de la neoplasia. Para su correcto diagnostico deben ser estudiadas mediante la realizacion de numerosos cortes, metodos especiales, estudio con microscopia electronica etc; con lo que se demuestra que estas zonas se continuan con areas tipicas de schwannomas.

6) Los tumores observados en las zonas alejadas de la inyeccion del producto mostraron al microscopio optico caracteres morfologicos homogeneos y de una sola estirpe histologica,

7) La supervivencia de los animales inyecctados con metilnitrosourea esta disminuida con respecto al grupo control. Las supervivencias mas pequenas se produjeron en las ratas que habiendo sido inyecctadas no desarrollaron tumor (19,2%). Ello creemos debe ser atribuido a la accion deleterea general del carcinogeno que conduciria en estos animales a un deterioro de la salud. En aquellos que pudieron sobrellevar este efecto general, la supervivencia respecto al grupo control tambien resulto acortada ^{es} quizas debido al desarrollo de neoplasias que les condujeron a la muerte.

8) En los animales que desarrollaron tumor no habia relacion estadisticamente significativa entre la supervivencia de los mismos y el tipo tumoral desarrollado. Ni encuanto a la supervivencia y la localizacion periferica o central de las neoplasias y dentro de un mismo tumor segun su tamaño y el grado de desdiferenciacion morfologico.

9) No hemos encontrado relacion estadisticamente significativa con respecto al numero de tumores inducidos con metilnitrosourea y el sexo de las ratas.

10) En la serie A-II (ratas hembras) la supervivencia de los animales que presentaron tumor fue mayor que la de los de la misma serie que fallecieron sin que se evidenciase el desarrollo de neoplasia. ($p=0.005$).

11) En la serie A-I (ratas macho) la supervivencia de los animales que presentaron tumor en cavidad craneal fue mayor que la de los de la misma serie en los que no se observo el desarrollo de neoplasia. ($p=0.021$).

266

264

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Adami L. Fisher D. and Moran T.: Influence of weight and obesity and risk breast cancer in an inselected Swedish population. Br. J. Cancer 36:787. 1977
- 2.- Alcantara E.N. and Speckman E.W.: Diet nutrition and cancer. Am.J. Clin. Nutr. 29:1035, 1976.
- 3.- Allen M.J.: Cancer of the urinary bladder induced in mice with metabolites of aromatic amines and tryptophan. Brit. J. Cancer. vol 11 nº 2:212, 1957.
- 4.- Alpert M-E. Hutt M.S. Wogan G.N. and Davidson C. Association beetwen aflatoxin content of food hepatoma frequency in Uganda. Cancer 28:253, 1971.
- 5.- Althoff J. Wisson R. and Mohr U. Diethylnitrosamine induced alterations in the tracheobronchial system of Syriam golden hamsters. J. Nat. Cancer Int. 46:1067, 1971
- 6.-Althoff J. Cardesa A. Pour P. and Morh U.: Carcinogenic effect of N-nitrosohexamethylenimine in Syriam golden hamsters. J. Natl. Cancer Int. 50:323, 1973.
- 7.- Althoff J. Kruger F.W. and Mohr U.: Carcinogenic effect of dipropylnitrosamine and compouds related by B-oxidacion. J. Natl. Cancer Int. 51:237,1973.
- 8.- Althoff J. Eagen M. and Grandjean C.:Carcinogenic effect

- of 2-dimethyl-dipropylnitrosamine in Syrian golden hamsters.: J. Natl. Cancer Inst. 55:1209, 1975.
- 9.- Althoff J. Eagen M. and Granjean C.: Dialylnitrosamine: a potent respiratory carcinogen in Syrian golden hamsters: brief communication.: J. Natl. Cancer Inst. 59:1569, 1977.
- 10.- Alvira M.M. Mandybur T. Menefee H.G.: Light microscopic and ultrastructural observations of a metastazing malignant epithelioid sdwannoma. Cancer 38:1977, 1976.
- 11.- Ames B.N. Durston W.E. Yamasaki E. and Lee F.D.: Carcinogens aren mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70:2281, 1973.
- 12.- Amilay A.S. and O'Gara R.W.: Enhancing the effect of riboflavin analog on azo-dye carcinogenesis in rats. J. Natl. Cancer Inst. 40:731, 1968.
- 12.- Argus M.F. and Cornelia Hoch-Ligetti.: Comparative study of the carcinogenic activity of nitrosamines. J. Natl. Cancer Inst. 27:3, 1961.
- 13.- Armitage P. and Doll R.: The age distribution of cancer and multistage theory of carcinogenesis. Brit. J. Cancer 8:1, 1954.

- 14.- Arndt A. and Amende.: Nitrosomethylurea. Z. Angew Chem. 43: 444, 1930.
- 15.- Arndt A. Loewe and Avan D.: Nitrosamethylurea. Ber. 73:606 1940.
- 16.- Barnes J.M. and Magee P.N.: Some Toxic properties of Dimethylnitrosamine. Brit. J. Ind. Med. 11:167, 1954.
- 17.- Bartsch H.: Some aspects of metabolic activation of chemical carcinogens in relation of their organ specificity. Arch. Toxicol. (berl) 39:1, 1977.
- 18.- Beatson G.T.: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. Lancet 2:104, 1896.
- 19.- Becker F.: Recent concepts of initiation and promotion in carcinogenesis. Am. J. Pat. vol. 105 n21, 1981.
- 20.- Beremblum I.: The cocarcinogenic action of croton resin. Cancer Res. 1:44, 1941.
- 21.- Beremblum I. and Shubik P.: The role of croton oil applications associated with a single painting of a carcinogen in tumour induction of the mouse skin. Brit. J. Cancer 1: 379, 1947.

- 22.- Beremblum I.: A re-evaluation of the concept of carcinogenesis. Prog. Exp. Tumor Res. II:21, 1969.
- 23.- Beremblum I.: Carcinogenesis as a biological problem. North. Holland Publishing Company New York. 1974.
- 24.- Beremblum I.: Cancer research in historical perspective: An autobiographical essay. Cancer Research 37:1, 1977.
- 25.- Bett W.R.: Historical aspects of cancer. In Cancer Vol 1 Butterworth, London 1957 pag 1.
- 26.- Bichat M.F.: Anatomie Generale. Brosson, Gabon and Cie Paris. 1821.
- 27.- Bielschowsky F.: Distant tumors produced by 2-amino and acetylaminofluorene. Brit. J. Exper. Pathol. 25:1, 1944.
- 28.- Bileschowsky F.: The role hormonal factors in the development of tumours induced by 2-aminofluorene and related compounds. Acta Un. Int. Cancer 17:121, 1961.
- 29.- Bollag W.: Prophylaxis of chemically induced benign and malignant epithelial tumours by vitamin A acid "retinoic acid". Eur. J. Cancer 8:639, 1972.
- 30.- Bonser G.M.: The carcinogenic activity of 2-naphthylamine. Brit. J. Cancer 10:3, 1956.

- 31.- Booth J. Keysell G.R. and Sims P.: Effects of oestradiol on the vitro metabolism of 7-12-dimethylbenzanthracene and its hydroxymethyl derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 23:735, 1974.
- 32.- Borzsöyü M. Pinter A.: The carcinogenicity of N-nitroso compounds formed endogenously in mice from Benzimidazole carbamate pesticides. *Neoplasma* 24:1, 1977.
- 33.- Bots G. and Willighagen.: Tumours in the mammary gland induced in Lewis rats intravenous Methylnitrosourea. *Br. J. Cancer* 31:3, 1974.
- 34.- Boyland E.: Different types of carcinogens and their possible modes of action. *Cancer Res.* 12:77, 1952.
- 35.- Brodie B.B. and Gillette J.R.: Concepts in chemical Pharmacology. Part II Springer New York eds. 1971.
- 36.- Brookes P. and Lawley P.: The reaction of mono and difunctional alkylating agents with nucleic acid and their constituent nucleotides. *Biochem J.* 89:127, 1963.
- 37.- Brookes P. and Lawley P.: Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin. Relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 202:781, 1964.

- 38.- Brookes P. and Lawley P.: Alkylating agents. Brit. Med. Bull 20:91, 1964.
- 39.- Bullon A. Merchan J. Martinez A.: Algunos caracteres electro-microscopicos de los tumores inducidos con nitrosaminas. Arch. Fac. Med. Madrid 23:205, 1973.
- 40.- Bullon A. Merchan J. Sala M.L.: Sobre la presencia de tumores medulares en ratas inyectadas con E.N.U.. Comunicacion libre presentada al VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anatomia Patologica. Torremolinos 1975.
- 41.- Butler W.H.: Morphological aspects of experimental renal tumours. Gann Monograph. an Cancer Research. 17:355, 1975.
- 42.- Butler W.H.: Morphological aspects of experimental renal tumours. Gann Monograph. an Cancer Research 17:355 1975.
- 43.- Cairns J.: Cancer: Ciencia y Sociedad. Ed. Reverte 1981.
- 44.- Cardesa A. Morh U. Pour P.: Vascular tumors in females Swiss mice after intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine. J. Natl. Cancer Inst. 51:1, 1973.
- 45.- Cardesa. A. Merchan J. Bullon A.: Morphological and biological comparison of tumours prenatally induced in Wistar rats by

- ethyl-nitroso-urea with their cointrepart in man. IV Int. Symposium on Carcinogenesis. Perugia. 1977.
- 46.- Chan P. Okamoto T. and Wynder E.: Possible role of riboflavin deficiency in epithelial neoplasia. III Induction of microsomal hydrocarbon hydroxylase. J.Natl. Cancer Inst. 48:1341, 1972.
- 47.- Chowdhury T.K. and Chou C.: Some electrical properties of chemically induced tumor cells. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1981, 1973.
- 48.- Clayson D.B.: A working hypothesis for the mode of carcinogenesis of aromatic amines. Brit. J. Cancer 7:4, 1953.
- 49.- Clayson D.: Chemical carcinogenesis. London J.Churchill Ed. pag 347, 1962.
- 50.- Clifton K.H. and Skidharan B-N.: Endocrine factor and tumor growth. In Cancer Vol III (f.f. Becker ed.) New York 1975.
- 51.- Cohen S.M.: Urinary bladder carcinogenesis: initiation-promotion. Seminars in Oncology. Vol VI 157, 1979.
- 52.- Cohnheim J.: Vorlesungen über allgemeine Pathologie. A. Hirschwald Berlin 1877.
- 53.- Conney A.H. and Burns J.J.: Metabolic interactions among

environmental chemicals and drugs. Science 178:576, 1972.

- 54.- Cook J.W. Hieger I. Kennaway E and Mayneord W.: The production of cancer by pure hydrocarbons. Proc. Roy Soc. Biol. 111:455, 1935.
- 55.- Cook J.W.: Production of cancer by pure hydrocarbons. Proc. Royal Soc. 113:277, 1933.
- 56.- Cox R. and Irving C.C.: Effect of N-methyl-nitrosourea on the DNA of rat bladder epithelium. Cancer Research. 36:11 1976.
- 57.- Decloitr F. Chauveau J. and Martin M.: Influence of age and 3-methylcholantreno on azo-dye carcinogenesis and metabolism of p-dimethyl-aminoazobenzene in rat liver. Inst. J. Cancer 11:676, 1973.
- 58.- Delinger R.H. Koesmert A. Wechsler W.: Induction of neurogenic tumors in C3 FeJ mice by nitrosourea derivatives. Observation by light microscopy, tissue culture and electron microscopy. Inst. J. Cancer 13:559, 1974.
- 59.- Dontenwill W.: Experimental investigations on the effects of cigarette smoke inhalation on small laboratory animals in Hanna, Nettesheim and Gilber inhalation carcinogenesis AEC Symposium series n° 18 (Conf. 691001) pp589, 1970.
- 60.- Druckrey H. Preussmann R. Schmahl D.: Carcinogenicity and

chemical structure of nitrosamines. Naturwissenschaft 48:134, 1961

- 61.- Druckrey H. Steinhoff D. Benthner H. Schander H. Klarner P.: Testin of nitrites for cronic toxicity in rats. Arzneimittelforschung 13:320, 1963.
- 62.- Druckrey H. Preussmann R. Ivankovic S. Schmidt C.H. and Stahl K.W.: Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durcg Dibutyl and Butyl N-butanol nitrosamin. Z. Krebsforsch. 66: 280, 1964.
- 63.- Druckrey H. Steinhoff D. Preussmann R. and Ivankovis.: Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methyl-nitroso-harnostoff und verschiedenen Dialkilnitrosaminen an Rattes. Z. Kresforsch 66:L 1964.
- 64.- Druckrey H. Ivankovic S. Preussmann R.: Selktive erzeugung maligner tumores in gehirn und ruckenmark von ratten durch N.methyl-N-nitrosaharnstoff. Z.Krebsforsch. 66:389, 1965.
- 65.- Druckrey H. Invankovic S. Preussmann R.: Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single inyec-tion of ethyl-nitrosourea to prenant rats. Nature 210:13 78, 1966.
- 66.- Druckrey H. Ivankovis S. Preussmann R.: Organotrope carci-nogene Wirkungen bei 65 verschiechene N-nitrosoverbnidungen and BD ratten. Z. Krebsforsch 69:10e, 1967.

and BD ratten. Z. Krebsforsch 69:103, 1967.

- 67.- Druckrey H.: Quantitative aspects in chemical carcinogenesis. En Truhant R (ed): Potencial carcinogenic hazards from drugs. U.I.C.C. MONOGRPH SERIES.Vol 7:60, 1967.
- 68.- Druckrey H. Ivankovic S. Preussmann R. Mennal H.D.: Selective induction of malignant tumors of the nervous system by resortive carcinogens. En Kirsch W.M. Grossi Paoletti Charles Thomas Sprintfield (Ilinois).
- 69.- Druckrey H.: Specific carcinogenic and teratogenic effet of indirect alkalatning methyl-and-ethyl compounds and the ir dependency an stages of ontogenic development. Xenobiotica 5:271 1973.
- 70.- Druckrey H.: Chemical structure and action in transplacental carcinogenesis and teratogenesis. En Transplacental carcinogenesis. IARC publication Lyon 1973.
- 71.- Druckrey H.: Chemical carcinogenesis with N¹-nitroso derivatives. En Odashima, S.Takayama Sato H. Recent topics in chemical carcinogenesis. Gann Monograph on Cancer Research 17:107, 1975.
- 72.- Dunning W.F. Curtis M.R. and Mann E.: The effect of added dietary tryptophan on the accurence of 2-acetylaminofluoreno induced liver and bladdre cancer in rats. Cancer Res.

10:454, 1950.

- 73.- Dutton A.H. Heath D.F.: Demethylation of dimethylnitrosamine in rats and mice. *Nature* (London) 178:644, 1956.
- 74.- Ebbsen P.: Aging increases susceptibility of mouse skin to DMBA carcinogenesis independent of general immune status. *Science* 183:217, 1974.
- 75.- Eckert H.: Tumorigenic effect of methylnitrosourea in mice. *Rev. Arch. für Geschwulstforschung* 38:1 1971.
- 76.- Eisenbrang S. Ivankovic R. Preussmann D. Schmahl D. and Wiesler. Some recent results on the chemistry formation and biological activity of n-nitroso compounds. *Gann Monograph on Cancer Research*. 17:143, 1975.
- 77.- Erlandson R.A.: Diagnostic transmission electron Microscopy of human tumors. Masson Publishing USA Inc. New York 1981.
- 78.- Estapé J. Nomdedeu B. Milla A.: Aspectos actuales de la quimioterapia antineoplásica. *Medicine* 71:619, 1975.
- 79.- Epstein S.S.: Environmental determinants of human cancer. *Cancer Res.* 34:2425, 1974.
- 80.-Farber E.: Biochemistry of carcinogenesis. *Cancer Res.* 23:1859, 1968.

- 81.- Fariña J.: Anatomia patologica ultrastructural de timo en la miastenia gravis. I Simposium internacional sobre miastenia gravis. Universidad autómoma Barcelona, mayo 1979.
- 82.- Frank L.M. and Carbomel A.N.: Effect of age on tumor induction in C57BL mice. J. Natl. Cancer Ints. 52:565, 1974.
- 83.- Freund H.A.: Clinical manifestation and studies in parenchymatous hepatitis. Ann Intern. Med 10:1144, 1937.
- 84.- Furth J.: Hormones as etiologic agents in neoplasia. In Cancer -A Comprehensive Treatise Vol I (F.F Becker ED). New York 1975.
- 85.- Ghadially F.: Inflammatory and degenerative disorders of joints en Johannsen JV: Electron Microscopy in Human medicine vol 4 Chap 1 McGraw-Hill New York 1981.
- 86.- Ghadially. F.N.: Diagnostic Electron Microscopy of tumors. Butterworths. London 1980.
- 87.- Golberg L. and Phil D.: Carcinogenesis testing chemical. E^U. C.R.C. Press pag. 83, 1973.
- 88.- Goldfarb S.: Sex hormones and hepatic neoplasia. Cancer Res 36:2584, 1976.
- 89.- Goth R. and Ragewaky H.: Ethylation of nucleic acids by

ethylnitrosurea L-14C in the fetal and adult rat. Cancer Res 32:1501, 1972.

- 90.- Graffi A. Hoffman F. and Schutt M.: N.methyl-n-nitrosurea as a strong topical carcinogen when painted on skin of rodents. Nature 214:611, 1967.
- 91.- Graw J. Graumant F.: Induction of malignant neurologic tumors in the offspring of Sprague-Dawley rats after transcutaneous applications of N-ethylnitrosourea during pregnancy. Zeits fur Krebs und Klin onkol. vol 81 2:169, 1973.
- 92.- Gullino P.M. Pettigrew F.H. Grautham F.: N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. J.Natl. Cancer Inst. 54:2, 1975.
- 93.- Gutmann H.R. Galitski S.B. and Foley W.A.: N-hydroxy-2-fluorenylbebazamide an arylhydroxamic acid with high carcinogenic activity. Nature 209:202, 1966.
- 94.- Haagensen D.: Enfermedades de la mama. Ed. Beta SRL 1979.
- 95.- Haas H. Mohr U. and Kruger F.W.: Comparative studies with different doses of N nitrosomorpholine, N nitrosomethylurea and dimethylnitrosamine in Syrian golden hamsters. J.Natl Cancer Inst. 51:1295, 1973.

- 96.- Hakin J.C. Reed R.: Tumors of the peripheral nervous System
Publis Armes forces Institute of Pathology Washington D.C
1969.
- 97.- Harding H.E.: Production of tumors in cats. Ann Rept Brit.
Emp Cancer Camp. 24:216, 1947.
- 98.- Harris C.C Kaufman D.S. Porn M. B. Smith J.M. Jackson F.
and Sagfiotti U.: Ultrastructural effect of N-methylnitro
sourea on the tracheobronchial epithelium of the syrian
golden hamster. Inst. J..Cancer Natl. 12:259, 1973.
- 99.- Hecker E.: Structrure activity relations ships in diterpe-
ne esters initant and cocarcinogenic to mouse skin in sla-
ga. T.J. Sivak A. Boutwell R.K. (eds):Carcinogenesis (vol
2) Mechanis of tumor promotion and cocarcinogenesis. New
York Raven 1977.
- 100.- Heidelberger C. And Jones H.B.: The distribution of radio-
activiti in the mouse following adminnistration of dibenzan-
tracene labeled in the 9 and 10 portions with carbon 14.
Cancer 1:252, 1948.
- 101.- Heidelberger C. and Moldehanver M.G.: The interaction of
carcinogenic hydrocarbons with tissue constituents. IV A
quantitative study of the binding to skin proteins of seve-
ral C14 labeled hydrocarbons. Cancer Res 16:442, 1956.

- 102.- Heidelberger C.: In vitro studies on the role of epoxides in carcinogenic hydrocarbon activation. In topics in Chemical carcinogenesis (W. Nakahara S. Takayama and Odashima Eds.) University of Tokyo Press 1972 p.371.
- 103.- Herrold K.: Carcinogenic effect on N-methyl-nitrosourea administered subcutaneously to Syrian hamster. J.Path. Bact. 92:35, 1966.
- 104.- Herrold K.: Adenocarcinoma of the intestine induced in Syrian hamster by N-methyl-n-nitrosourea. Pathol. Vol. 6:403 1969.
- 105.- Hicks R.M. Wakefield J.J. and Chowaniec J.: Carcinogenic action of saccharine in the chemical induction of bladder cancer. Nature 243:347, 1973.
- 106.- Hilfrich J. Baner J. Aton Z. and Morh U.: Methodist einfache Cytodiagnostik carcinogen-induzierter Lungen Tumoren an syrischen Goldhamstern. Z. Krebsforsch 79:71; 1973.
- 107.- Hill D. Kirk M.C. and Struck F.: Microsomal metabolism of nitrosoureas. Cancer research 35:2, 1975.
- 108.- Hill J.: Cautions against the immoderate use of snuff. London Balshwni R. 1761. N. Engl. J. Med 282:18, 1970.
- 109.- Hill M.J.: Bacteria and the etiology of colonic cancer.

cer. Cancer 34:815, 1974.

- 110.- Hiraki S.: Carcinogenic effect of N-Ndimethylnitrosourea on syrian golden hamster. Gann. 62:321, 1971.
- 111.- Hiraki S.: N-Dimethylnitrosourea induced tumors in mice and Syrian hamster. Acta Med. Okayama 28:333, 1974.
- 112.- Hoch-Ligetti C. Lobl L.T. Arvin J.M.: Effect of nitrosamine derivatives on enzyme concentrations in rat organs during carcinogenesis. Brit. J. Cancer 18:2, 1964
- 113.- Homburger F. Janiscgh W. Dolen L.: Chemical carcinogenesis in syrian golden hamster. Fed Proc. 37:2090, 1978.
- 114.- Homburger F.: Chemical carcinogenesis in syrian golden hamster: a review (though 1976) Prog. Exp. Tumor Res. 23:100 1979.
- 115.- Horsfall F.L.Jr.: A unifying concep of the genesis of cancer. Acta Ann Int. Contra Cancrun 19:668, 1963.
- 116.- Hosokawa M. gotohda E. and Kobayash H.: Leukemia and mamary tumor in rats administred N-nitrosobutylurea Gann 62:557, 1971.
- 117.- Hynes R.O.: Cell surface proteins and malignant trns -

formation. Biochem/Biophys Acta 458:73, 1976.

- 118.- Jacobiec F.A. Font R.L.: Ocular and orbital tumors .
En Electron Microscopic in Human Medicine. Vol 6. Jo
hannssen Editor. Chap. 8 Mc Grw-Hill New York 1979.
- 119.- Janisch W. and Schruher D.: Experimentelle hirugeschwu-
bei Kanichen nach injerltion von methylnitrosoharnstoff.
Naturwissenschaften 54:171, 1967.
- 120.- Kardinal C.K.: Introduction history milestones in can-
cer researsch. Seminars in oncology Vol VI n° 4 pag.
395, 1979.
- 121.- Kelly M. O'Gara R. Yancey S. and Botkin C.: Carcinogen
of lmethyl-nitrosoarea in newborn mice and rats. J.
Natl. Cancer Inst. 41: 619, 1968.
- 122.- Kennaway E.L. and Hiege I.: Carcinogenic substances and
their fluorescence spectra. Brit. Med. J. 1:1044, 1930.
- 123.- Kennaway E. Kennaway N.: Some factors affecting carcino-
gens. Acta Intern. Uman. against Cancer 2:101, 1927.
- 124.- Kleihnes P. Mennel H.D. and Koestner A.: Alkylierung
von unkleinsauere in He La- Zellen fur M-methyl-N-nitro-
so harnstoff und liweis fur eine repair-systhese. Verh.

Stsch. Ges. Path. 54 Tagung Fisher. 1970.

125.- Kleihnes P. and Patzchle K.: Verteilung von N14 C-methyl nitroharnstoff in der Rattenach systemischer applikation. Z. Krebsforsch 75:193, 1971.

126.- Koesnert A. Swenberg J.A. and Wechler W.: Transplacental prodcutiion with ethylnitrosoarea of neoplsms of the nervous system in spregne-dawley rats. Am. J. Pathol. 63:37, 1971

127.- Koesnert. A. Swenberg J. A. Wechsler W.: Experimental tumours of the nervous system induced by resortive N-notrosoarea compounds. EnBingham W.G. Recent advances in brain Tumor Research . Prog. Exp. Tumor. Res. Kanger libri. Basillia. 1972.

128.- Kowalewski K. and Todd E.F.: Carcinoma of the ganbladder induced in hamster by insection of cholesterol pellets and feeding dimethylnitrosamine. Proc. Soc. Exp. Bol. Med. 136:482, 1971.

129.- Koyama T. Honda J. Hancha H. and Matsumoto S.: Methyl-nitrosoarea induced malformations of brain in SD-J-DL rats. Arch. Neurol. 22:342, 1970.

130.- Kreybrig T. Von.: Experimentelle pranatal toxikolo-

gie. Arzneimittelforschung suppl. 17 pp 1, 1968.

- 131.- Kruger F.W. Walker and Weissler M.: Carcinogenic action of dimethylnitrosamine in trout no related to methylation of nucleic acids and protein in vivo. *Experientia* 26:520, 1970.
- 132.- Lan Bo Chen P.H. Gallimore H. and McDouglas K.: Correlation between tumor induction and the large external transformation sensitive protein on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3570, 1976.
- 133.- Laqueur G.L.: Contribution of intestinal macroflora and microflora to carcinogenesis in carcinoma of the colon and antecedent Epithelium (W J. Burdette Ed) pp305, 1970.
- 134.- Leaver D. Swann P. Magee P.: The induction of tumor in the rat by a single oral dose of N-nitrosomethylurea. *Brit. J. Cancer* 23:177, 1969.
- 135.- Lennox B.: The production of a variety of skin tumours in rats with 2-antramine, and a comparison with the effect in mice. *Brit. J. Cancer* 9:4,631, 1955.
- 136.- Lever W. and Schanmburg G.: *Histopatologia de la piel*. E.A. Interamericana Pag. 580, 1979.
- 137.- Levine G. Med M. Rosai J. Robert M. Bearman M. and Aaran

- Polliack.: The fine esturcture of thymonas with emphasis an its differential diagnosis. Am. J. Pathol. 13:6, 1975.
- 138.- Lisinsky W. and Epstein S.: Nitrosamines as enviromental carcinogens. Nature 225:21, 1970.
- 139.- Littefield N.A. Mc Douglas C.: Effects of dose and time in a long-term lowe dose carcinogenic study. J. Env. Patho. Toxi. 3:17, 1980.
- 140.- Lovelless A.: Possible revelance of O-6-Alkylation of deoxiguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. Nature (Londoan) 223:206, 1969,
- 141.- Maekawa A. and Odashima S.: Induction of tumors of the nervous system in the ACN rat with 1-Butyll-nitrosourea administred trasplacentally, neonatally or via maternal. Gann Japanese J. of Cancer 66:2, 1975.
- 142.- Maekawa A. Ishiwata H. and Odashima S.: Trasplacental carcinogenesis and chemical determination of 1-Butyl-nitrosourea in stomach content after simultaneous oral administration of 1-butylurea and sodium nitrite to ACN rats. Gann Japanese J. of Cancer 68:1, 1977.
- 143.- Magee P.H. and Barnes J. N.: The production of malig-

nant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. Brit. J. Cancer 10:1, 1956.

- 144.- Magee P.N. and Barnes J.M.: Induction of kidney tumours in the rat with dimethylnitrosamine. J.Pathol. Bacte. 84:19, 1962.
- 145.- Magee P.N. and Barnes J.M.: Carcinogenic nitroso compounds. Adva. Cancer Research. 10:163, 1967.
- 146.- Magee P.N. and Farber E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat- liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. Biochem.J. 83:114, 1962.
- 147.- Magee P.N. Montesano R. and Preussmann R.: N-nitroso compounds and related carcinogens, in searle C.E. (ed) Chemical carcinogens: Washington D.C. American Chemical Society. A.C.S. Monograph. 173, 1976.
- 148.- Magee P.N. and Swann P.F.: Nitroso compounds. Brit. Med. Bull 25:250, 1969.
- 149.- Maher V.M. Miller E.C. Miller J.A. and Szybalski W. Mutations and decreases in density of transforming DNA produced by derivatives of the carcinogens 2-acetylaminofluorence and N-methyl-aminoazobenzene. Mol. Pharmacol 4:41, 1968,

- 150.- Margison G.P. Curtin N.J. Snell K. and Craig A.W.:
Effect of chronic n-diethylnitrosamine on the excision
of O6 Ethylguanine from rat liver DNA. Brit. J. Cancer
40:5, 1979.
- 151.- Marroquin F. and Farber E.: The apparent binding of ra-
dioactive 2 acetylaminofluorne to rat liver ribonucleic
acid in vivo. Biochem. Biophys. Acta 55:403, 1962.
- 152.- Marton J.F.: Plants associated with esophageal cancer
cases in Curacao. Cancer Res 28:2268, 1968.
- 153.- Mc Lean A.E. and Magee P.N.: Increased renal carcino-
genesis by dimethylnitrosamine in protien deficient
rats. Brit. J. Exp. Pathol. 51:587, 1970.
- 154.- Mc Lean A.E. and Marshall A.: Reduced carcinogenic
effect of aflatoxin in rats given phenobarbitone. Brit.
J. Exp. Pathol. 52:322, 1971.
- 155.- Miller E.C. and Miller J.A.: The presence and signifi-
cance of bond aminoazodyes in the lives of rats fed.
p-dimethylaminoazbenzene. Cancer Res 7:468, 1947.
- 156.- Miller E.C. Miller J.A. Kline E. and Rusch H.P.: Corre-
lation of the level of hepatic riboflavin with the appe-
arance of liver tumors in rats fed aminoazodyes. J.
Exp. Med. 88:89, 1948.

- 157.- Miller E.C. and Miller J.A.: In vivo combinations between carcinogens and tissue constituents and their possible role in carcinogenesis. *Cancer* 12:547, 1952.
- 158.- Miller E.C. and Miller J.A.: The induction of tumours in rats with small amounts of N-hydroxi 2-acetylaminofluorene or its cupric chelate. *Proc. Am. Assoc. Cancer Research*. 3:344, 1962.
- 159.- Miller E.C. and Miller J. A.: Mechanisms of chemical carcinogenesis. Nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol. Rev.* 18:805, 1966.
- 160.- Miller J.A.: Carcinogenesis by Chemicals. An overview. *Cancer Res.* 30:559, 1970.
- 161.- Miller J.A. and Miller E.C.: Chemical carcinogenesis. Mechanisms and approaches to its control. *J. Natl. Cancer Inst.* 47:V-XIII 1971.
- 162.- Miller E.C. and Miller J. A.: Milestones in chemical carcinogenesis. *Seminars in oncology* Vol VI n^o4, 1979.
- 163.- Miller R.W.: Environmental carcinogenesis. Summary of a conference on epidemiology at the XI International Cancer Congress *Pag.* 303. *J. Natl. Cancer Inst.* 54:

2, 1975.

- 164.- Mochizuki M. Anjo T. Wakabayash Y. and Okada M.: Mutagenic and DNA damage effects of N-alkyl-N (acetoxymethyl) nitrosamines, models for metabolically activated N-N-dialkyl nitrosamines. Gann Japon. Cancer Research. 70:5 1979.
- 166.- Mohr U. Haas H. and Hilfrich J.: The carcinogenic effect of dimethylnitrosamine and nitrosomethylurea in european hamster. Brit. J. Cancer 29:5, 1974.
- 167.- Mohr U. Kruger F. and Cardesa A.: Carcinogenic effect of N-nitrosomorpholine and N-nitrosopiperidine on European hamsters. J. Natl. Cancer Inst. 53:1, 1974.
- 163.- Montesano R.: Systemic carcinogens (N-nitroso compounds) and synergistic or additive effects in respiratory carcinogenesis. Tumori. 56:335, 1970.
- 169.- Montesano R. Saffiotti M. Ferrero A. and Kanfman D.G.: Synergistic effects of benzo(a)pyrene and diethylnitrosamine on respiratory carcinogenesis in hamster. J. Natl. Cancer Inst. 53:1395, 1974.
- 170.- Montesano R.: Alkylation of DNA and carcinogenicity of N-nitroso compounds. J. Toxi. Env. Health. 6:1001, 1980-

- 171.- Montgomery I.A. James R. Mc Caleb G.S. and Johnston T.:
The modes of descompositions of 1-3-bis(2-choloroethyl)
1-nitrosourea an related compounds. J. Med. Chem. 10:
668, 1967.
- 172.- Morris H.P. Dubnil C.S. and Johnson J.M.: Studies of
the carcinogenic action in the rat of 2-nitro, 2-amino
2 acetilamino and 2-diacetylaminofluorene ofter inges-
tion and after painting. J. Natl. Cancer Inst. 10:1201,
1959.
- 173.- Morris H.P. Velat C.A. Wagner B.D. Dahlgand M. and Ray
F.P.: Studies of carcinogenicity in the rat of deriva-
tives of aromatic amines related to N-2-fluoreylaceta-
mide. J. Natl. Cancer Inst. 24:149, 1960.
- 174.- Morris H.P. Sidransky H. and Wagner B.P.: Influence of
a diet low in pyridexine on tumorigenesis in rats in-
gesting N-2-fluorenylacetamide. Tumori 49:159, 1963.
- 175.- Mortimer B. Lipsett.: Interation of drugs, hormones
and nutrition in the causes of cancer. Cancer 43:5,
1979.
- 176.- Mottram J.C.: A sensitizing facto in experimental blas-
togenesis. J. Pathol. Bact. 56:391, 1944.
- 177.- Muller J.: Ueber den feineren Ban und die Formen der

Kraukhaften. Geschwülste Riener Berlin. 1838.

- 178.- Naha P.M.: Unique protein in the nucleus of a cell line transformed by the carcinogen methylnitrosourea. Brit. J. Cancer 31:5, 1975.
- 179.- Narasiwa T. and Weisburger J.: Colon cancer induction in mice intrarectal instillation of N-methylnitrosourea. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148:166, 1975.
- 180.- Nebert D.W. Bausserman L.L. and Bates R.R.: Effects of 17 Beta-estradiol and testosterone on argyl hydrocarbon hydroxylase activity in mouse tissues in vivo and in cell culture. Inst. J. Cancer 6:470, 1970.
- 181.- Nemoto N. and Takayama S.: Formation of N 7-methylguanidine in nuclear DNA and cytoplasmic RNA in mice on continuous oral administration of dimethylnitrosamine solution. Z. Krebsforsch 80:113, 1973.
- 182.- Nicolson G.L.: Trans-membrane control of the receptor in normal and tumor cell.II. Surface changes associated with transformation and malignancy. Bioch. Bioph. Acta 458:1, 1976.
- 183.- Nilsson A. and Broome-Karlsson A.: Influence of steroid hormones on the carcinogenicity of Sr. Acta Rad. 15:5, 1976.

- 184.- Nixon L.D. Koller J.E. and Exon J.A.: Effect of methyl mercury chloride on transplacental tumors induced by sodium nitrite and ethylurea in rats. J. Nat. Cancer Inst. 63:4, 1979.
- 185.- MacKay B.: Diagnostic Electron Microscopy. Apleton Century-Crofts. New York 1981.
- 186.- Martinez A. Merchan J. Sala M. Renedo G. Fernandez J. and Bullon A.: Carcinogenesis y nitrosamidas. Patologia 7:225, 1974.
- 187.- Merchan J. Martinez A. Fernandez J. Sala M. Bullon A.: Caracteristicas morfologicas de los tumores neuroectodermicos inducidos con nitrosamidas. II. Patologia 7: 297, 1974.
- 188.- Mohr U. Althoff J.: Die diaplazentare Wirkung der cancerogens diathynitrosamin bei der mens. Z. Krebsforsch 67:152, 1965.
- 189.- Mohr U. Reznik G. and Pour P: Carcinogenic effect of diisopropanolnitrosamine in sprague Dawley rats. J. Natl. Cancer Inst. 58:2 1977.
- 190.- Montesano R. and Saffiotti U.: Carcinogenic response of the respiratory tract of syrian golden hamster to di-

fferent doses of diethylnitrosamine. Cancer Res. 28:
2197, 1968.

- 191.- Moriva K. Mitsumori M. Kato K. Niyazawa Y. and Shirasu
Y.: Carcinogenicity of N-nitroso-Ethylenetiourea in fe-
male mice. Cancer Letters 7:6, 1979.
- 192.- Novinsky N.: B.M. Shikin Centennial of experimental can-
cer research. Inst. J. Cancer 18:130, 1976.
- 193.- Odashima S. Ogiu O. Toshiaki Y. Maekawa A. and Nakada
T.: Leukemias induced by 1 alkyl-nitrosoureas in Don
ryn rats. Gann Monograph. on Cancer Research 17:405,
1975.
- 194.- Odashima S.: Overview: N-nitroso compounds as carcinogen
for experimental animals and man. Oncology 37:282, 1980.
- 195.- Okada M. Suzuki E. Aoki J. Iyoshi M. and Hashimoto Y.:
Metabolism and carcinogenicity of N-buthyl n-14-hydro
xybutyl nitrosamine and related compounds with special
reference to induction of mammary bladder tumors. Gann
Monograph. Cancer Research 17:161, 1975.
- 196.- Orhan Bulay and Sidney S.: Carcinogenesis in rat eso-
phagus by intraperitoneal injection of different do-
ses of Methyl-N- amyl nitrosamine. Cancer Research. 39:
9, 1978.

- 197.- Orham B. Sidney S. Mirvich S. Garcia H. Delfrene A.
Gold B and Eagen M.: Carcinogenicity test of six nitro-
samides and a nitrosacyanamide adminitred to rats. J.
Natl. Cancer Inst. 62:6, 1979.
- 198.- Owen R. Ramage C. and Simonsen C.: Nitrosomethylurea.
J. Chem. Soc. 1213, 1938.
- 199.- Paipre A.J. and McLean A.E.: The effects of dietary pro-
tein and fat on the activity of arge hydrocarbon hydro-
xylase in rat liver, kidney and lung. Biochem. Pharma.
22:2875, 1973.
- 200.- Patterson D.S. and Roberts B.A.: Steroid sex hormones
as inhibitors of aflatoxin metabolism in liver homoge-
nates. Experientia 929, 1972.
- 201.- Peraino C. Fry R.J. Staffeldt E. and Kisiekieski W. E.:
Effect of varyin the expouse to phenobarbital on its
enhancement of 2-acetylaminofluorene induced hepatic
tumorigenesis in the rat. Cancer Res. 33:2701, 1973.
- 202.- Pfaffenroth M.J. and Das G.D.: N-ethylnitrosourea
induced spinal tumours in an lubred strain of W al-
bino rats. J. Natl. Cancer Inst. 63:3, 1979.
- 203.- Pitot H.: Fundamentos de oncologia. Ed. Reverte 1981.

- 204.- Poirier L. Lionel A.: Hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine in rat fed high dietary levels of lipotropes. J. Natl. Cancer Inst. 54:i, 1975.
- 205.- Pogusianz H.E.: Comparative studies of mutagenic and carcinogenic action of certain chemical. Neoplasma. 20=5, 1973.
- 206.-Pott P.: Chirurgical observations relative to the cancer of the scrotum 1775. Reprinted in J. Natl. Cancer Inst. 10:7, 1963.
- 207.- Pour P. Kruger F.W. Althoff J. and Mohr U.: Carcinogenic effect of di-n-propylnitrosamine in syrian golden hamster. J. Natl. Cancer Inst. 51:1019, 1973.
- 208.- Pour P. Cardesa A. Althoff J. and Mohr U.: Tumorigenesis in the nasal olfactory region of syrian golden hamster as a result of di-n-prppylnitrosamine. Cancer Res 34:16, 1974.
- 209.- Pour P. Kruger F. Cardesa A. Althoff J. and Mohr U.: Tumorigenicity of methyl-n-propylnitrosamine in Syrian golden hamster. J. Natl. Cancer Inst. 53:457, 1974.
- 210.-Pour P. Kruger F.W. Althoff J. Cardesa and Mohr.U.: Effect of beta oxidized nitrosamines on syrian golden hamster. I. 2-hydroxypropyln-propylnitrosamine. J. Natl.

- Cancer Inst. 52:1245, 1974.
- 211.- Pour P. Kruger F. Althoff J. Cardesa A. and Mohr U.:
Effect of beta oxidized nitrosamines on syrian hamster.
III. 2-2 dihydroxy-di-n-propylnitrosamine. J. Natl.
Cancer Inst. 54:141, 1975.
- 212.- Pour P. Kmoch N. Gruser E. Mohr U. Althoff J. and Car-
desa A.: Spontaneous tumors and common diseases in two
colonies of syrian hamsters. I. Incidence and sites.
J.Natl. Cancer Inst. 56:931, 1976.
- 213.- Pour P. Mohr U. Cardesa A. Althoff J. and Kmoch N.: Spon-
taneous tumors and common diseases in two colonies of
syrian hamster. II. Respiratory tract and digestive
system. J. Natl. Cancer Inst. 56:937, 1976.
- 214.- Pour P. Wallcane L. Gingell D. Donal N. Lawson T. Sal-
masi S and Tines S.: Carcinogenic effect of N-nitroso
2-hydroxypropyl-2-oxopropilamine, a postulated proxima
te pancreatic carcinogen in syrian hamstrs. Cancer Re-
search. 39:10, 1979.
- 215.- Preussman R. Hengy H. and Druckrey H.: Studies on the
detection of alkylating agents. I. Spectrophotometric de-
termination of diazoalkanes with 4-14-nitrobenzylpyri-
dinium perchorate. Chem. Ann. 684:57, 1965.

- 216.- Prutkin L.: Modification of the effect of vitamin A acid on the skin tumor keratoacanthoma by application of actinomycin D. Cancer Res 31:1080, 1971.
- 217.- Rao M. S. Reddy J. K.: Induction of malignant vasvular tumors of the liver in guinea pigs treated with 2-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine. J. Natl. Cancer Inst. 58:2, 1977.
- 218.- Rao M. S. and Reddy J. K.: Pathology of tumors developed in guinea pigs intraperitoneal injection of N-methylnitrosoarea. Neoplasma 24:1, 1977.
- 219.- Reddy J.K. and Rao M. S.: Pancreatic adenocarcinoma in inbred guinea pigs induced by N-methylnitrosoarea. Cancer Res 35:2269, 1975.
- 220.- Regelson W. Kim U. Ospma J. and Holland J.: Hemangio-endothelial sarcoma of liver from chronic arsenical intoxication by fowlers solution. Cancer 21:514, 1968.
- 221.- Renber M.D. and Lee C.W.: Effect of age and sex on hepatic lesion in buffalo strain rats ingesting diethylnitrosamine. J. Natl. Cancer Inst. 41:1133, 1968.
- 223.- Renike : En Sala Verdu Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense Madrid 1977.

- 224.- Ribbert T.: En Sala Verdu Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense Madrid 1977.
- 225.- Reznik G. and Mohr U.: Induction of renal pelvic tumors in spragne Dawley rats by di-isopropanolnitrosamine. Cancer Res. 2:2, 1976.
- 226.- Roe F.J. Carter R.L. Mitcheley B. Peto R. and Hecker E.: On the persistence of tumour initiation and the acceleration of tumor progression in mouse skin tumorigenesis. Inst. J. Cancer 9:264, 1972.
- 227.- Roe F.: Chemical carcinogenesis animal and man. En Scientific foudation of oncology Ed. Symmgton Ltd Londres pp.265. 1976.
- 228.- Rogers A.E. Sanchez O. Feison F. and Newnernw P.M.: Dietary enhancemant of nitrosamine carcinogenesis. Cancer Research. 34:1, 1974.
- 229.- Rogers A.E.: Reduction of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in rats by lipotrope or amino acid supplementation of marginally deficient diet. Cancer Research. 37:1, 1977.
- 230.- Ross M. H. and Bras G.: Influence of protein nuder and overnutrition on spontaneous tumor prevalence in the rat.

J. Nutri. 103:944, 1973.

231.- Rous P. Transmission of a malignant new growth by means of a cell free filtrate. J. Am. Med Assoc. 56:198, 1911.

232.- Rustia M. and Shibik P.: Effects of trasplacental exposure to diethylbestrol on carcinogenic susceptibility during postnatal life in hamster progeny. Cancer Research 39:11, 1979.

233.- Sala Veru M.L.: Tesis doctoral. Facultad de medicina Universidad complutense Madrid. 1977.

234.- Salaman M.H.: Co.carcinogenesis. Brit. Med. Bull 20: 139, 1964.

235.- Sander J. und Butkle G.: Induktion maligner tumoren bei Ratten durvh gleichzeitige Verfütterung von Nitrit und sekundären aminen. Z. Krebsforsch 13:54, 1969.

236.- Sasaky T. and Yoshida T.: Experimentelle Erzeugung des Lebercarcinoms durch Futternun o-amidoazotoluol. Virchow Arch. Pathol Anat. 295:175, 1935.

237.- Schmahl D.: Problems of dose-response studies in chemical carcinogenesis with special reference to N-nitroso compounds. C R C Crit. Rev Toxicol 6:267, 1979.

- 238.- Schmahl D.: Experimental investigations on the influence upon the chemical carcinogenesis combinations studies with ethylnitrosourea. *Zeits fur Krebs und Klin Onkol.* 82:2, 1980.
- 239.- Schoental R. and Rive D.J.: Interaction of N-alkyl-n-nitrosourethanes with thiols. *Biocem J.* 97:446, 1974.
- 240.- Schoental R.: The mechanism of action of the carcinogenic nitroso and related compounds. *The Brt. J. Cancer* 28:5, 1973.
- 241.-Schottenfeld D.: Alcohol as co-factor in etiology of cancer. *Cancer* 43:5, 1979.
- 242.-Shaw-Kong C. Harrington G. Rothstein M. Shergalis W. Swern D. and Vohra S.: Accelerating effect of ascorbic acid on n-nitrosamine formation and nitrosation by oxyhyponitrite. *Cancer research.* 39:10 1979.
- 243.- Shear M.J.: Studies in carcinogenesis.V. Methyl derivatives of 1-2-benzanthracene. *Am.J.Cancer* 33:499, 1938.
- 244.- Shinkin B.M.: Centennial of experimental cancer research. *Int. J. Cancer* 18:130, 1976.
- 245.- Sobel H.J. Morquet E. and Schwarz R.: Is schwannoma related to granular cell myoblastoma?. *Arch. Pathol.* 95:

396, 1973.

- .246.- Sobel H.J. Marquet E. Sobrinho M. and Johannessen V.: Tumors and tumors-like conditions of soft tissues. En Johannessen Ed. Electron Microscopy in Human Medicine. Vol 4 cap. 3 1981.
- 247.- Sorof S. Young E.M. and Ott M.G.: Soluble liver protein during hepatocarcinogenesis by aminoazodies and 2-acetylaminofluorene in the rat. Cancer Res 18:33, 1958.
- 248.- Sporn M. B. and Dingman C. W.: 2-acetaminofluorene and 3-methylcholantrene. Differences in binding to rat liver deoxyribonucleic acid in vivo. Nature 210:531, 1966-
- 248.- Sporn M. B. Squire R.A. Brown C.C Smitg J. Wenk M. and springer S.: 13 cis retinoic acid inhibitions of bladder carcinogens in the rat. Science 195:487, 1977.
- 249.- Stenbactk F. Ferrero A. Montesano R. and Shubick P.: Synergistic effect of fenic oxide on dimethylnitrosamine carcinogenesis in the syrian golden hamster. Z. Krebsforsch 79:31, 1973.
- 250.- Stewart B.W.: Enviromental chemical carcinogenesis. Med. J. Aut. 1:92, 1978.
- 251.- Stoeber and Wacker.: Sala Tesis doctoral Facultad de

Medicina. Universidad Complutense. Madrid. 1977.

- 252.- Stora C.: Cellular localitation of chemical carcinogens studied by fluorescence microscopy. *Oncology* 37:20, 1980.
- 253.- Ströobant G. and Brucher J. M.: Estude de tumeurs nerveuses obtebeus par l'administration de N.M.U. an rat. *Neurochir* 14:515 Paris 1968.
- 254.- Sweaberg J. Koesnert A. Wehsier W. and Hiroshi A.: Differential oncogenic effect of methylnitrosoarea. *J. Natl. Cancer Inst.* 54:1, 1975.
- 255.- Swenber J. Koestner A. and Wechsles W.: The induction of tumours of the Nervous system with intravenous methylnitrosoarea. *Lab Invest.* 26:74, 1972.
- 256.- Sunderman F.W.: Metal carcinogenesis in experimental animals. *Food Cosmet Toxicol* 9:105, 1971.
- 257.- Takahaski M. Fukushuma S. and Hananouchi M.: Induction of undifferentiated adenocarcinoma in the stomach of rats by N-methylnitro-n-nitrosoguanidine with various kinds of surfatant. *Gann Monograph. Cancer Research.* 17:255, 1975.

- 258.- Takayama S. Hitachi M. and Yamada K.: Histological and cytological studies on hepatocarcinogenesis in rats by administration of diethylnitrosamine. Gann Monograph. Cancer Research 17:343, 1975.
- 259.- Taper H.S. Brucher J.M. and Fort. L.: Histoencyzmologie des nucleases dans le systeme nerveus central humain a l'etat normal et neoplastique. Proc Vi Int Cong. Neuropath. 540. Masson Paris 1970-
- 260.- Taxy J. Battifore H.:Electron microscope in the study and diagnosis of soft tissue tumors. En Trump El. Diagnostic Electron Microscopy Vol 3 Pp 97, New York 1980.
- 261.- Terracini B. and Testa M.C.: Carcinogenicity of a single administration of N-nitrosomethylurea. A Comparison beetween newborn and 5 week old mice and rats. Brit. J. Cancer 24:588, 1970.
- 262.- Thomas P.K.: The deposition of collagen in relation to Schwann cell basement membrana during peripheral nerve regeneration. J. Cell Biol 23:375, 1964.
- 263.- Thomas C. Sierra I and Kerstung G.: Hirntumoren bei Ratten nach oraler Gabe von N-nitrosomethylhasnstoff Naturwissnschaften 54:223, 1957.

- 264.- Tomatis L. Partensky C. and Montesano R.: The predictive induction in carcinogenicity testing. A literature survey. *Inst. J. Cancer* 12:1, 1973.
- 265.- Tomatis L- Ponomarev U and Trusev U.: Effect of ethyl nitrosourea administration during pregnancy on three subsequent generations of BDV rats. *Int. J. Cancer* 19: 2, 1977.
- 266.- Toth B.: A critical review experiments in chemical carcinogenesis using newborn animals. *Cancer Res* 28:727, 1968.
- 267.- Vasilieva N. and Milieuskaya I.L.: Embryonal rhabdomyoblastomas induced by methyl nitrosourea in the diencephalic pouch of Syrian hamster. *Bull Eksp Biol* 72:71, 1972.
- 268.- Vesselinovitch S.D. Rao K. and Mihailovich N.: Transplacental and lactational carcinogenesis by safrole. *Cancer Research*. 39:11 1979.
- 269.- Virchow R.: Die Krankhaften Geschwulste. A. Hirschwald Berlin 1858.
- 270.- Von Volkman. En Miller and Miller. Milestones in chemical carcinogenesis. *Seminars in oncology* Vol VI 1979.

- 271.- Walpole A.L. and Willians M.C.: Aromatic amines as carcinogens in industry. Brit. Med. Bull 14:2, 1958.
- 272.- Warzok R. Thust R. Mendel J. Schwarz H. and Blauzuss E.: Methylnitrosophenylurea a highly carcinogenic compounds. Cancer Letters Vol4:5, 1978.
- 273.- Wayne H. and Willian L.: Tumor induction in rats by feeding heptamethylencimine and nitrite in water. Cancer Research 35:3 1975.
- 274.- Wechsle W.: Old an new concepts on oncogenesis in the nervous system of man and animals. Progress in Experimental tumor Research 17 Ed. W.G. Bingham and Kager 1972.
- 275.- Wheeler G.P.: Duration on inhibition of synthesis of DNA in tumors of nitrosoureas. Cancer Research 34:8, 1957.
- 276.- Weisburger E.K. and Weisburger J.H.: Chemistry carcinogenicity and metabolism of 2-fluorenamine and related compounds. Adv. Cancer Res. 5:331, 1958
- 277.- Weisburger J. H.: Chemical carcinogenesis in the gastrointestinal tract in seveth National Cancer Proceeding pp465. Amer. Cancer Soc. New York. 1973
- 278.- Weisburger J.H. and Weisburger E.K.: Biochemical formation and pharmacological toxicological and pathological

properties of hydroxylamines and hydroxamic acids. *Phar. Rev.* 25:1, 1973.

279.- Weisburger J.H. and Willians G.M.: Metabolism of chemical carcinogens. *Cancer VI* (F.F. becker ed) Plenum, New York 1975.

280.- Weisburger J.H.: Chemical carcinogenesis. *En Scientific Foundation of oncology Ed. Symmgtion Londres 1976* pag 45.

281.- Weisburger E.K.: Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Ann Rev. Pharmacol Toxicol.* 18:395, 1978.

282.- Wold W. S and Green M.: Historic milestones in cancer virology. *Seminars oncology Vol VI 1979.*

283.- Wilson R.H. Eds F. and Cos A.J.Jr.: The carcinogenic activity of 2-acetaminofluorene.II.Effects of concentration and duration of exposure. *Cancer Res* 7:444, 1947

284.- Woodruff J.M. Chernik N. Smith M. Millet W. and Foot F.: Peripheral nerve tumors with rhabdomyosarcomatous differentiation. *Cancer* 32:426, 1973.

285.- Woodruff J.M.: Peripheral tumors showing glandular differentiation (Glandular Schwannomas. *Cancer* 37: 1976.

- 286.- Woods M. and Smith C.: The carcinogenic activity of di butylnitrosamine in IFx057 mice. European J. Cancer 6: 5 pag. 433 1970.
- 287.- Wynder E. and Rauscher F.: Etiologia del Cancer. Ed, Panamericana 1977.
- 288.- Yamagiwa K. and Ichikawa K.: Experimentille studie uber die pathogeuse der Epithelialgeschwiste. Mitteilnugen Med. Facultat. Kaiserl Univ. Tokyo 15:295, 1915.
- 289.- Yamagiwa K and Ichikawa K.: Experimental study of the Pathogenesis of carcinoma. J.Cancer Res. 3:1, 1918.
- 290.- Yano K. and Isobe M.: Mutagenicity of N-methyl-aryl-nitrosoureas and n-methyl-aryl -methyl-nitrosoureas in relation to their alkalating activity. Cancer Research 39:11, 1979.
- 291.- Yarita Tsutomu Nettesheim P. and Williams L.: Tumor . induction in the trachea of hamster with N.nitroso-N-metilurea. Cancer Researsch 38:1167, 1976.
- 292.- Yoshida T.: Uber die serienweise Verfolgung der Veranderungen de leber bei der experimentellen hepatomerzeugung durch O-Amidoazotoluol. Trans Jap. Pathol. Soc. 23:636,1933.

- 293.- Zimmerman H.M. and Arnold H.: Experimental brain tumors produced with benzypirene. Am. J. Ptho. 19:939, 1943.
- 294.- Zimmerman H. M.: Brain Tumors their incidence and classification in man and their experimental production. Ann N. Acad Scien 159:337, 1967.
- 295.- Zulch K. J. and Mennel H. D.: Recent results of chemically induced tumors of the nervous system. Proc. VI Int. Cong. Neuroph. 60:83, Masson Paris 1970.

